

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Laboratório de Fisiologia Cardiovascular

Tese de Doutorado

EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO COM HORMÔNIOS T3 E T4 COMO
ALTERNATIVA AO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO PARA MELHORAR O
REMODELAMENTO CARDÍACO E A CAPACIDADE FÍSICA DE RATOS WISTAR
APÓS O INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL

Rayane Brinck Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

PORTO ALEGRE

2018

RAYANE BRINCK TEIXEIRA

EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO COM HORMÔNIOS T3 E T4 COMO
ALTERNATIVA AO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO PARA MELHORAR O
REMODELAMENTO CARDÍACO E A CAPACIDADE FÍSICA DE RATOS WISTAR
APÓS O INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, como
requisito para obtenção do grau de
doutora em Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander da
Rosa Araujo.

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Brinck Teixeira, Rayane

EFICIÊNCIA DO TRATAMENTO COM HORMÔNIOS T3 E T4
COMO ALTERNATIVA AO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO PARA
MELHORAR O REMODELAMENTO CARDÍACO E A CAPACIDADE
FÍSICA DE RATOS WISTAR APÓS O INFARTO AGUDO DO
MIOCÁRDIO EXPERIMENTAL / Rayane Brinck Teixeira. --
2018.

115 f.

Orientador: Alex Sander da Rosa Araujo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Infarto agudo do miocárdio. 2. Treinamento
físico aeróbico. 3. Hormônios T3 e T4. 4. Remodelamento
cardíaco. 5. Músculo esquelético. I. da Rosa Araujo,
Alex Sander, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha avó paterna *Edite da Silva Teixeira (in memorian)*, e ao meu avô materno *Rosa dos Santos Brinck (in memorian)*, grandes exemplos de carinho, bondade e humildade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me capacitar a cada dia.

Agradeço imensamente a minha família e amigos pelo apoio incondicional, em especial ao meu marido pela sua disposição em compartilhar cada momento e cada conquista realizada no decorrer deste trabalho.

Aos professores do laboratório de fisiologia cardiovascular e espécies reativas de oxigênio, Dra. Adriane Belló-Klein e Dr. Paulo Schenkel, e em especial ao meu orientador Dr. Alex Sander da Rosa Araujo pela confiança que depositou em mim.

Ao Dr. Pawan K. Singal pela sua contribuição a este trabalho e pelo aprendizado que me foi proporcionado.

Aos colegas do laboratório por todas as trocas de experiência e crescimento profissional como grupo de pesquisa. Agradeço a Cristina Campos Carraro, Alexandre Luz de Castro, Alexandre Hickmann, Francielle Pereira, Rafaela Siqueira, Patrick Türck e Bruna Lima-Seolin pelo auxílio no decorrer do protocolo experimental. Agradecimento especial a Alexsandra Zimmer cujo apoio e parceria foram fundamentais para os frutos deste trabalho.

À Tânia pelo suporte técnico e por estar sempre disposta a nos ajudar.

À Alessandra Godoy e Isnard Litvin pela parceria com as análises histológicas.

À Karina Rabello Casali e Ingrid Dias pela parceria com a análise espectral.

À professora Iraci Torres, a Isabel Macedo, a professora Maria Beatriz, a Elvira Cordero, a Gabriela, e ao Rafael Colombo pelas contribuições dadas a este trabalho.

Ao CnPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma fizeram contribuições a este trabalho, pois com certeza não teria o mesmo resultado sem a ajuda de vocês.

A todos o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Doenças cardiovasculares e o infarto agudo do miocárdio.....	17
1.2 Fisiopatologia e processo de remodelamento após infarto	18
1.2.1 Papel do estresse oxidativo no remodelamento pós infarto.....	19
1.2.2 A inflamação aliada ao estresse oxidativo	20
1.2.3 O estresse oxidativo e o desenvolvimento de Fibrose.....	21
1.2.4 Alterações no balanço autonômico	22
1.2.5 Alterações na função cardiovascular	24
1.3 Papel do treinamento físico após o IM	26
1.4 Papel dos hormônios tireoidianos após o IM	27
2 JUSTIFICATIVA	30
3 HIPÓTESE	31
4 OBJETIVOS	32
4.1 Geral	32
4.2 Específicos.....	32
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
5.1 Considerações Éticas	34
5.2 Amostra e desenho experimental.....	34
5.3 Cirurgia SHAM e de indução de IM.....	36
5.4 Ecocardiografia	38
5.5 Intervenções terapêuticas realizadas após o IM	38
5.5.1 Protocolo de treinamento físico aeróbico em esteira	38
5.5.2 Administração de solução de hormônios T3 e T4 por meio de gavagem ..	42
5.6 Hemodinâmica do ventrículo esquerdo.....	42
5.7 Hemodinâmica vascular e análise espectral	43
5.7.1 Procedimento para avaliação hemodinâmica	43

5.7.2 Análise das ondas e análise espectral.....	44
5.8 Coleta de sangue, eutanásia e coleta de tecidos.....	44
5.9 Morfometria	45
5.10 Análises bioquímicas e de estresse oxidativo	45
5.10.1 Dosagem hormonal no plasma	45
5.10.2 Dosagem de glicogênio no pulmão e no músculo gastrocnêmio	46
5.10.3 Preparação do homogeneizado de tecido para análises de estresse oxidativo.....	46
5.10.4 Avaliação da concentração total de espécies reativas de oxigênio	47
5.10.5 Quantificação de Peróxido de Hidrogênio.....	47
5.10.6 Quantificação de lipoperoxidação	47
5.10.7 Quantificação dos grupos sulfidrilas	47
5.10.8 Atividade da Superóxido dismutase	47
5.10.9 Atividade da Catalase	48
5.10.10 Atividade da Glutathione Peroxidase	48
5.11 Análise histológica de fibrose do VE	48
5.12 Análise histológica do pulmão e gastrocnêmio	49
5.13 Análise da expressão de proteínas por Western blot.....	49
5.14 Cuidados com relação ao descarte da amostra e materiais tóxicos	50
5.15 Análise estatística	50
6 RESULTADOS	51
6.1 Artigo 1	51
6.2 Artigo 2.....	61
6.3 Artigo 3 – versão parcial	71
7 DISCUSSÃO	97
8 CONCLUSÃO.....	104
9 PERSPECTIVAS DO ESTUDO.....	105
10 REFERÊNCIAS.....	106
ANEXO I – Comprovante de aprovação ética do estudo	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do desenho experimental e divisão de grupos do estudo	35
Figura 2. Imagens de coração submetido a cirurgia SHAM ou a de indução de IM.....	37
Figura 3. Imagem da esteira utilizada durante o protocolo experimental.....	39
Figura 4. Administração de dose intragástrica por gavagem.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo de treinamento resumido.....	40
Tabela 2. Protocolo de treinamento detalhado.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK	Proteína cinase ativada por adenosina monofosfato
ATP	Trifosfato de adenosina
CAT	Catalase
CREAL	Centro de reprodução e experimentação de animais de laboratório
DCF	Diclorofluoresceína oxidada
DCFH	2,7-Diclorofluoresceína
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET-1	Endotelina 1
ET_A	Receptor de ET-1 do tipo A
ET_B	Receptor de ET-1 do tipo B
FC	Frequência cardíaca
GSH	Glutathiona reduzida
GSHPX	Glutathiona peroxidase
GSSG	Dissulfeto de glutathiona/ glutathiona oxidada
H₂O	Água
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIF1-α	Fator 1 alfa induzido por hipóxia
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 quilodáltons
i.p.	Intraperitoneal
ICBS	Instituto de ciências básicas da saúde
IM	Infarto agudo do miocárdio
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
MYH 1/2/4/6	Isoformas 1/2/4/6 da cadeia pesada da miosina
Na₂SO₄	Sulfato de sódio
NaCO₃	Carbonato de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NaOH	Hidróxido de sódio
NFκB	Fator nuclear kappa beta
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O₂^{•-}	Ânion radical superóxido
O₂	Oxigênio
OH[•]	Radical hidroxila
ONOO⁻	Peroxinitrito
PAD	Pressão arterial diastólica
p-Akt	Proteína cinase B fosforilada
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica

PGC1-α	Coativador 1 alfa do receptor gama ativado por proliferação de peroxisoma
p-Gsk3β	Glicogênio sintase cinase 3 β fosforilada
PI3K	Fosfoinositol 3 cinase
PLB	Fosfolambam
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
p-PLB	Fosfolambam fosforilada
Prx	Peroxirredoxina
RyR	Receptor rianodina
s.c.	Subcutânea
SERCA	Cálcio ATPase do retículo sarcoendoplasmático
SNA	Sistema nervoso autonômico
SNCI	Sistema nervoso cardíaco intrínseco
SOD	Superóxido dismutase
SPSS	Pacote estatístico para ciências sociais
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
t-Akt	Proteína cinase B total
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TEM	Teste de esforço máximo
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
t-Gsk3β	Glicogênio sintase cinase 3 β total
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzoico
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TSH	Hormônio estimulador da tireoide
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
v.o.	Via oral
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VO_{2max}	Consumo máximo de oxigênio
α/β-MHC	Isoforma alfa/beta da cadeia pesada da miosina
HF-SAPV	Variabilidade da pressão arterial sistólica no componente de alta frequência
USOD	Unidades de SOD

RESUMO

Introdução: Sobreviventes ao infarto agudo do miocárdio enfrentam declínio progressivo na qualidade de vida, devido a alterações patológicas sistêmicas que levam à insuficiência cardíaca, intolerância ao exercício e limitação da realização de tarefas diárias. O treinamento físico é um método coadjuvante para melhorar a qualidade de vida destes pacientes, porém nem sempre pode ser utilizado com segurança, tornando necessário o desenvolvimento de outras alternativas que possam ser aplicadas nestes casos. O tratamento com T3 e/ouT4 foi recentemente demonstrado como uma alternativa viável para melhorar a função cardiovascular após o infarto. Contudo, ainda é necessário estabelecer uma dosagem e tempo de tratamento adequados, bem como verificar os seus efeitos em outros órgãos como o pulmão e a musculatura esquelética, além de validar este tratamento, o comparando com uma alternativa já utilizada. **Objetivo:** O presente estudo propôs comparar os efeitos benéficos da baixa dose dos hormônios tireoidianos e o treinamento físico sobre parâmetros de função cardíaca, vasculares, pulmonares e sobre a musculatura esquelética de ratos Wistar após o infarto do miocárdio induzido experimentalmente.

Materiais e métodos: Para isso, utilizamos o modelo experimental de indução cirúrgica de infarto agudo do miocárdio em ratos Wistar machos. Os ratos foram divididos em 4 grupos (n=8/grupo): um grupo SHAM, submetido à simulação cirúrgica; e três grupos infarto, submetidos à cirurgia de indução de infarto. Dentre os grupos infarto, o primeiro, assim como o SHAM, não recebeu intervenção; o segundo foi submetido ao treinamento físico em esteira; e o terceiro recebeu hormônios T3 e T4 por gavagem. As duas intervenções foram iniciadas uma semana após o infarto, e ambas foram realizadas 5 vezes por semana (de segunda a sexta), durante 9 semanas. O treinamento físico foi realizado em esteira adaptada para ratos, e o protocolo consistiu em aumento gradual do tempo e intensidade de treinamento até atingir 60 minutos e 40% da velocidade do teste de esforço máximo (realizado na primeira e quarta semana após a cirurgia, e novamente ao final do protocolo). O tratamento com hormônios T3 e T4 foi administrado diariamente por gavagem (T3 a 1,2µg/100g/dia e T4 a 4,8µg/100g/dia). O peso corporal dos animais foi monitorado semanalmente. A avaliação ecocardiográfica, por outro lado, foi monitorada 48 horas e 10 semanas depois da cirurgia. Após a última ecocardiografia, foram analisados os seguintes parâmetros: 1. No ventrículo esquerdo: parâmetros de função e

contratilidade a partir da pressão intraventricular, morfometria, estresse oxidativo, expressão de proteínas de manejo do cálcio e marcadores de insuficiência cardíaca e análise histológica de fibrose; 2. No ventrículo direito: morfometria e estresse oxidativo; 3. Na artéria femoral: modulação autonômica central e vascular; 4. No pulmão: morfometria, estresse oxidativo, conteúdo de glicogênio e análise histológica para presença de macrófagos e infiltrado inflamatório; 5. No gastrocnêmio: morfometria, estresse oxidativo, conteúdo de glicogênio e análise histológica de hipertrofia. **Resultados:** Ambos treinamento físico e tratamento com hormônios T3 e T4 melhoraram a função sistólica do ventrículo esquerdo após o infarto. No entanto, o tratamento com hormônios da tireoide também reduziu a área de infarto e aumentou a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, o que não ocorreu com o treinamento físico. Os hormônios T3 e T4 também induziram hipertrofia cardíaca mais intensa, aumento da relação força-frequência de estimulação e melhora das proteínas do manejo do cálcio no ventrículo esquerdo quando comparados ao treinamento físico. O treinamento físico foi mais eficaz na redução de fibrose do ventrículo esquerdo, embora o tratamento hormonal também tenha mostrado bom resultado. Nenhuma das intervenções causou aumento na frequência cardíaca ou alteração nos níveis plasmáticos de T3, T4 ou TSH, e ambas melhoraram marcadores de insuficiência cardíaca. Nenhuma das intervenções teve efeitos no ventrículo direito. Diferente do treinamento físico, o tratamento com hormônios T3 e T4 foi capaz de melhorar a modulação autonômica sobre a variabilidade da pressão arterial sistólica. Ambas as intervenções aumentaram a geração de peróxido pulmonar, concomitantemente à restauração no número de macrófagos e aumento do infiltrado inflamatório. Não houve alteração nos níveis de glicogênio, tanto no pulmão quanto no gastrocnêmio. Ambas as intervenções induziram hipertrofia no músculo gastrocnêmio, embora mais intensa com o tratamento hormonal. No entanto, os hormônios T3 e T4 promoveram aumento no nível de sulfidrilas no gastrocnêmio, o que não ocorreu com o treinamento físico. **Conclusão:** Ambas as intervenções promoveram benefícios similares à função cardíaca e pulmonar, e melhoraram a capacidade física dos animais infartados. O tratamento com hormônios T3 e T4 proporcionou benefícios adicionais de relaxamento vascular e hipertrofia mais intensa acompanhada de proteção antioxidante no músculo gastrocnêmio quando comparado ao treinamento físico. O tratamento combinado de baixa dose de T3 e T4 não causou efeitos adversos sobre preditores de insuficiência

cardíaca, como a alteração dos níveis de T3, T4 e TSH, e o aumento da frequência cardíaca. No entanto, o tratamento com T3 e T4 aumentou a lipoperoxidação e reduziu as defesas antioxidantes no ventrículo esquerdo, o que pode indicar que a dosagem, ou o tempo de tratamento utilizado neste estudo, ainda não é a escolha ideal. Embora sejam necessários mais estudos, o tratamento com baixa dose de hormônios tireoidianos pode vir a ser uma alternativa nos casos em que não há um método eficaz para melhorar a tolerância ao exercício, principalmente em casos de insuficiência cardíaca após o infarto.

ABSTRACT

Introduction: Acute myocardial infarction survivors face a progressive decline in their lifespan, due to pathological alterations that lead to heart failure, exercise intolerance and daily tasks limitation. The aerobic exercise training is a coadjutant approach to improve the quality of post-infarction life. Nevertheless, there are some cases in which the exercise is not a safe alternative and other alternatives may be necessary. The combined treatment using T3 and T4 hormones was recently shown as a potential alternative to improve the cardiovascular function after myocardial infarction. However, it is still necessary to find an ideal dosage and treatment duration, as well as verify the thyroid hormones effects on other organs such as the lung and the skeletal musculature. Besides, a comparison with a well-accepted alternative could validate T3 and T4 hormones as a possible coadjutant approach after myocardial infarction. **Aim:** The purpose of the present study was to compare the beneficial effects of low dose thyroid hormones and the aerobic exercise training on parameters of cardiac, vascular, pulmonary and skeletal muscle function of Wistar rats after experimentally induced myocardial infarction. **Material and Methods:** The experimental model of surgery-induced acute myocardial infarction was reproduced in male Wistar rats. The rats were divided into 4 groups (n = 8/ group): one SHAM group, who underwent a surgical simulation; and three infarcted groups, subjected to infarction induction surgery. Among the infarcted groups, the first, as well as the SHAM group, had no intervention; the second underwent treadmill exercise training; and the third received T3 and T4 hormones by gavage. The two interventions started one week after infarction, and both interventions were performed 5 days per week (from Monday to Friday), for 9 weeks. The exercise training was carried out on a treadmill adapted for rats, and the protocol consisted of a gradual increase on the duration and intensity, until reach 60 minutes and 40% of the maximal exercise test velocity (performed in the first and fourth week after surgery and again at the end of the protocol). The treatment with T3 and T4 hormones consisted in a daily gavage (T3 at 1.2 μ g / 100g / day and T4 at 4.8 μ g / 100g / day). Animals' body weight was monitored weekly. The echocardiographic evaluation, on the other hand, was held 48 hours and 10 weeks after surgery. After the final echocardiography, the following parameters were analyzed: 1. In the left ventricle: function and contractility from intraventricular pressure, morphometry, oxidative stress, expression of calcium-handling proteins and markers of heart failure, and histological

analysis of fibrosis; 2. In the right ventricle: morphometry and oxidative stress; 3. In the femoral artery: central and vascular autonomic modulation; 4. In the lung: morphometry, oxidative stress, glycogen content and histological analysis for the presence of macrophages and inflammatory infiltrate; 5. In the gastrocnemius muscle: morphometry, oxidative stress, glycogen content and histological analysis of hypertrophy. **Results:** Both exercise training and T3 and T4 hormones treatment improved the left ventricular systolic function after infarction. However, the thyroid hormones treatment also reduced the infarction area and increased left ventricular ejection fraction, which was not promoted by exercise training. T3 and T4 hormones treatment also intensified the cardiac hypertrophy, increased the force-frequency relationship, and improved the calcium handling proteins in the left ventricle when compared to the exercise training. On the other hand, the aerobic exercise training was more effective in the left ventricular fibrosis reduction, although the hormonal treatment also showed good results. Both interventions had no adverse effect on the heart rate or in T3, T4, and TSH plasma levels, and both enhanced heart failure markers. Both interventions had no effects on the right ventricle. Differently from physical training, the treatment with T3 and T4 hormones improved the autonomic modulation on systolic blood pressure variability. Both interventions increased the pulmonary peroxide generation, concomitantly restored the macrophages number and increased the inflammatory infiltrate. The glycogen levels were unaltered in both lung and gastrocnemius. Both interventions induced hypertrophy in the gastrocnemius muscle, although it was intensified due to the hormonal treatment. Moreover, the T3 and T4 hormone treatment promoted an increase in the gastrocnemius sulfhydryl levels, which did not happen in the trained group. **Conclusion:** Both interventions promoted similar benefits to cardiac and pulmonary function, and improved the physical capacity of infarcted animals. T3 and T4 hormones treatment provided additional benefits on the vascular relaxation and a more intense hypertrophy, accompanied by antioxidant protection in the gastrocnemius when compared to the exercise training. Likewise the exercise training, the low-dose T3 and T4 combined treatment did not alter the T3, T4 and TSH levels, nor the heart rate, which are used as predictors of heart failure. On the other hand, the treatment with T3 and T4 hormones increased the lipoperoxidation and reduced the antioxidant defenses in the left ventricle, which may indicate that the dosage or the treatment duration used in this

study is not yet the ideal choice. Although further studies are necessary, the low-dose thyroid hormones therapy may be an alternative in cases where there is no other effective method for improving the exercise tolerance, especially in the cases of heart failure following infarction.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares e o infarto agudo do miocárdio

As doenças cardiovasculares são globalmente classificadas como não comunicáveis, e consistem em um grupo de doenças que afetam o sistema cardiovascular. Elas são divididas em doença cardíaca reumática; doença cardíaca hipertensiva; doença cardíaca isquêmica; acidente vascular encefálico (isquêmico e hemorrágico); cardiomiopatia, miocardite e endocardite; e outras doenças circulatórias. Dentre as doenças cardiovasculares, o infarto agudo do miocárdio (IM), por ser o resultado de um processo isquêmico, é classificado como uma doença cardíaca isquêmica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016a).

Conforme dados da Organização mundial da saúde, do total mundial de mortes no ano de 2015, 70% foram devido a doenças não comunicáveis. Dentro destes 70%, as doenças cardiovasculares ocupam o primeiro lugar, sendo a doença isquêmica do coração a maior causadora de mortes em nível mundial, alcançando 8.756.000 (oito milhões e 756 mil) mortes em 2015 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016b).

No Brasil, o total de óbitos em 2015 foi de 1.264.174 milhão, segundo o DATASUS (DATASUS, 2015). Deste valor absoluto, 111.863 mil ocorreram devido a doenças isquêmicas do coração, sendo 90.811 mil por IM e 70.896 mil por outras doenças cardíacas. Estes dados demonstram que o IM é a principal doença do coração causadora de óbitos no Brasil. Segundo consta na literatura, o IM é responsável pela morte de milhões de pessoas no mundo todos os anos, com taxa de mortalidade de aproximadamente 10% (PERRELLI; PAGLIARO; PENNA, 2011).

O IM ocorre devido à obstrução do fluxo sanguíneo, que gera redução da disponibilidade de oxigênio e nutrientes, os quais são essenciais para a manutenção da homeostase do miocárdio. A redução desses elementos ocasiona alterações vasculares e teciduais, culminando em lesão irreversível e morte celular. Como consequência, a área afetada perde a sua função, gerando grande déficit na perfusão sanguínea e alterações patológicas locais e sistêmicas (KUMAR et al., 2009; VENUGOPAL et al., 2012).

O desenvolvimento da doença cardiovascular e ocorrência de IM está atrelado a diversas condições patológicas. Tais condições representam fatores de risco para a

ocorrência de IM, uma vez que afetam funções fisiológicas, gerando alterações intravasculares e, em longo prazo, podem causar obstrução do suprimento sanguíneo e IM. Dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e IM estão hipertensão, obesidade, aterosclerose, diabetes melito, fumo, inatividade física, maus hábitos alimentares e hipercolesterolemia (CAMARGO-RAMOS; CORREA-BAUTISTA; RAM, 2017; COHEN; TONG, 2010; LIM et al., 2017; OSIPOV et al., 2009; POLYCHRONOPOULOS et al., 2010; WANG; NAKAYAMA, 2010; ZHANG et al., 2006).

Dentre estes fatores, acredita-se que a base etiológica das doenças cardiovasculares possa estar em parte na modificação no estilo de vida da população devido ao processo de urbanização mundial, fato que induziu a adoção de hábitos alimentares inadequados e inatividade física, os quais podem ser relacionados com o aumento progressivo da mortalidade e morbidade por doenças cardiovasculares. Apesar da taxa de mortalidade devido ao infarto ser considerada baixa em relação a sua incidência, estima-se que cerca de 30% das pessoas que sobrevivem após o infarto passam a enfrentar diversos problemas e patologias secundárias, que se desenvolvem como consequência do processo de remodelamento e alterações fisiopatológicas que se iniciam após o infarto, começando a nível local no coração e podendo afetar os mais diversos órgãos e sistemas corporais (FLACHSKAMPF et al., 2010).

1.2 Fisiopatologia e processo de remodelamento após infarto

O IM gera uma isquemia aguda na musculatura ventricular, privando as células de receberem perfusão e nutrição adequadas e, portanto, prejudicando as atividades e funções celulares. Com isso, os cardiomiócitos presentes na região isquêmica acabam perdendo a sua função, tornam-se necróticos e dão origem a cicatriz gerada pelo infarto. Entretanto, a cicatrização representa uma perda da atividade contrátil do ventrículo esquerdo (VE), prejudicando a perfusão corporal, o que induz diversas adaptações estruturais com a finalidade de garantir a perfusão adequada aos diferentes órgãos. Esse processo, chamado de remodelamento cardíaco, não somente depende da área de infarto, como também é um preditor da progressão para o estágio de insuficiência cardíaca. O remodelamento ventricular é clinicamente

definido como um aumento mínimo em 20% no volume diastólico final do VE, verificado no primeiro exame de imagem após o infarto. Porém, o remodelamento do VE é caracterizado por aumento progressivo tanto da pressão diastólica quanto da sistólica final (GALLI; LOMBARDI, 2016).

O processo de remodelamento está não apenas estritamente associado à indução de estresse oxidativo, à ativação de reação inflamatória e à deposição de colágeno no local da lesão isquêmica, como também envolve mudanças no miocárdio remanescente, incluindo o desenvolvimento de fibrose intersticial, o remodelamento do sistema nervoso cardíaco intrínseco e o remodelamento vascular (RAJENDRAN et al., 2016; SUN, 2009; TALMAN; RUSKOHO, 2016).

1.2.1 Papel do estresse oxidativo no remodelamento pós infarto

Em condições fisiológicas, durante o processo de geração de trifosfato de adenosina (ATP) nas mitocôndrias, são formadas baixas concentrações de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em baixas concentrações, as EROs são fundamentais para a sinalização celular. Todavia, tornam-se deletérias quando em altas concentrações, podendo reagir com o óxido nítrico (NO) e gerar agentes com alta reatividade como o peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$). Para manter os níveis ideais de concentração de EROs, existem substâncias antioxidantes endógenas responsáveis pela manutenção dos níveis fisiológicos destas espécies, que atuam diminuindo ou prevenindo a oxidação de substratos (AGO et al., 2011; COHEN; TONG, 2010).

Os principais agentes antioxidantes enzimáticos são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GSHPx) (COHEN; TONG, 2010; PARAVICINI; TOUYZ, 2008). Após sua formação, o $O_2^{\cdot-}$ é dismutado pela SOD para H_2O_2 , podendo ser posteriormente convertido em água (H_2O) e oxigênio (O_2) por diversos tipos de peroxidases, como a GSHPx, a CAT ou a peroxiredoxina (Prx) (COX; WINTERBOURN; HAMPTON, 2010). A ocorrência de IM gera um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e os antioxidantes, com aumento de oxidantes e redução de antioxidantes, levando ao acúmulo excessivo de espécies reativas e ao estabelecimento do estresse oxidativo (HILL; SINGAL, 1997; PERRELLI; PAGLIARO; PENNA, 2011). O estresse oxidativo induzido pelo IM ocorre tanto na região da isquemia quanto no miocárdio remanescente (SUN, 2009).

O excesso de EROs, especificamente de $O_2^{\cdot-}$, inativa o vasodilatador NO, levando à disfunção endotelial e vasoconstrição (LINKE; ERBS; HAMBRECHT, 2008), o que é prejudicial na situação isquêmica. Além da disfunção endotelial e vasoconstrição, o aumento de EROs prejudica o relaxamento vascular, aumenta o crescimento e hipertrofia de células vasculares de músculo liso, aumenta a deposição de proteínas de matriz extracelular e induz inflamação (COHEN; TONG, 2010; SUN, 2009). Por isso a ruptura da homeostase redox desempenha um papel chave na patogênese do IM.

1.2.2 A inflamação aliada ao estresse oxidativo

A resposta inflamatória tem início com a migração de neutrófilos e monócitos para o local afetado logo após a isquemia, atingindo o seu pico entre 1 a 2 semanas após o infarto, e sendo finalizada entre 3 a 4 semanas após o infarto (SUN, 2009). Os neutrófilos e monócitos são as primeiras células que expressam a enzima fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) oxidase, a qual é a maior fonte de $O_2^{\cdot-}$ no coração. Aliado a este fato, os macrófagos aumentam também a produção de NO. Nessa condição, o $O_2^{\cdot-}$ excedente pode rapidamente reagir com o NO, formando $ONOO^{\cdot-}$, ou ser convertido a H_2O_2 e gerar o radical hidroxila (OH^{\cdot}), ambos com efeitos deletérios. Além disso, o fator nuclear kappa beta ($NF\kappa\beta$), um mediador chave do processo inflamatório, é sensível ao estado redox, sendo ativado pelo excesso de EROs após o IM. Uma vez ativado, o $NF\kappa\beta$ estimula a resposta inflamatória e o crescimento celular (SUN, 2009). Contudo, outras citocinas como o fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), e interleucinas 1β e 6 são produzidas durante o processo isquêmico e, podem regular tanto a sobrevivência quanto a morte celular.

Durante o reparo tecidual, as citocinas inflamatórias ativam a angiogênese e mobilizam células tronco, contribuindo para o remodelamento. Por outro lado, a ativação de $NF\kappa\beta$ gera a produção de $TNF-\alpha$, levando tanto à resposta hipertrófica quanto à ativação de vias de morte celular. Em contrapartida, as citocinas inflamatórias estimuladas pelo estresse oxidativo também atuam estimulando a formação adicional de espécies reativas, agravando ainda mais a inflamação (HORI; NISHIDA, 2009). Cronicamente, as EROs e citocinas inflamatórias ativam metaloproteinases e causam a deposição de colágeno e, portanto, o desenvolvimento de fibrose. A ativação de metaloproteinases, por outro lado, causa a degradação dos

depósitos de colágeno, resultando em dilatação do VE. Aliado a isso, tanto o desequilíbrio redox quanto o processo inflamatório prejudicam a homeostase do cálcio nos cardiomiócitos, afetando a contratilidade cardíaca.

Durante o estresse oxidativo, as EROs induzem sobrecarga intracelular de cálcio; aumentam a lipoperoxidação de membranas e abrem canais de cálcio, causando influxo de cálcio extracelular. Este cenário causa a liberação dos estoques intracelulares de cálcio e reduz a captação deste cátion por meio da cálcio ATPase do retículo sarcoendoplasmático (SERCA). Citocinas inflamatórias, como o TNF- α e a interleucina 6, também têm seu papel na desregulação do metabolismo do cálcio. O TNF- α reduz a sensibilidade das miofibrilas ao cálcio e inibe a expressão da SERCA2a, causando drástica redução do cálcio no retículo sarcoendoplasmático (HORI; NISHIDA, 2009).

1.2.3 O estresse oxidativo e o desenvolvimento de fibrose

Juntamente com o estresse oxidativo e a indução de inflamação após o IM, a isquemia causa também a morte maciça de cardiomiócitos. Cerca de um milhão de células cardíacas morrem em decorrência da isquemia. Como a capacidade do coração em se regenerar após o dano isquêmico é muito limitada, as células que morreram acabam sendo substituídas por tecido fibroso (LAFLAMME; MURRY, 2005).

Embora o desenvolvimento de fibrose na área afetada pela isquemia mantenha a integridade da estrutura miocárdica sendo, portanto, fundamental para a recuperação do coração, o desenvolvimento de fibrose no tecido remanescente prejudica a função cardíaca (SUN, 2009). Isso porque a cicatriz formada pelo desenvolvimento de fibrose na área de infarto é essencial para prevenir a ruptura da parede ventricular após a isquemia (SHINDE; FRANGOGIANNIS, 2014; VAN DEN BORNE et al., 2010). Contudo, o estresse mecânico gerado pela isquemia, juntamente com fatores hormonais induz a expansão do tecido conectivo para áreas remotas a zona de infarto, causando fibrose reativa. A fibrose reativa no miocárdio remanescente causa alterações conformacionais na câmara cardíaca e aumento da espessura ventricular, comprometendo o débito cardíaco (TALMAN; RUSKOAHIO, 2016). Além disso, tanto o tecido fibroso que forma a cicatriz do infarto quanto a fibrose intersticial interferem na função elétrica cardíaca, predispondo o coração a arritmias (STUART et al., 2016).

A fibrose cardíaca é considerada um fator de risco isolado na insuficiência cardíaca, pois predispõe os pacientes insuficientes à morte repentina, independente se há prejuízo ou não na fração de ejeção (GULATI et al., 2013). Além disso, estudos demonstram que o estresse oxidativo induz o desenvolvimento de fibrose não apenas na região do coração afetada pela isquemia, mas também em diversos outros tecidos, como o fígado, pulmão e artérias. Portanto, esses efeitos remotos contribuem para o declínio da função não apenas cardíaca, mas também do organismo como um todo. A indução de fibrose nos diversos tecidos ocorre devido ao aumento das EROs, que estimulam a expressão do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e de colágeno do tipo I, além de promover a proliferação de fibroblastos e a expressão desses fatores no tecido cardíaco (SUN, 2009). A deposição de colágeno se torna evidente uma semana após o IM, enquanto a cicatriz pode ser observada na segunda semana após o evento isquêmico. No entanto, a deposição de colágeno continua ao longo de 8 semanas após o IM (SUN, 2009).

1.2.4 Alterações no balanço autonômico

Assim como a fibrose, alterações no sistema nervoso autonômico (SNA) exercem um papel crucial na indução de arritmias e na progressão para insuficiência cardíaca após o IM, levando à morte cardíaca repentina (FUKUDA et al., 2015; SHEN; ZIPES, 2014; VASEGHI; SHIVKUMAR, 2008). No coração, as fibras do SNA se organizam em uma rede local de gânglios e nervos interconectados, denominada de sistema nervoso cardíaco intrínseco (SNCI) (ARMOUR, 2008). O SNCI é responsável, juntamente com aferências de centros superiores, pela regulação da excitabilidade e da função contrátil, tanto elétrica quanto mecânica, do coração (ARDELL, 2004; ARMOUR, 2004; RAJENDRAN et al., 2016). Contudo, O SNCI também pode controlar reflexos intracardíacos de forma independente dos centros superiores (ARDELL et al., 1991).

O IM afeta o SNCI, gerando sinais aferentes de dano cardíaco que são transmitidos aos centros superiores (ARMOUR, 1999). Ao mesmo tempo, o IM leva à alteração morfológica e neuroquímica de alguns gânglios cardíacos intrínsecos, processo chamado de remodelamento estrutural. Este remodelamento é acompanhado por alterações funcionais no processamento tanto de sinais aferentes quanto eferentes pelo SNCI, aliadas ao declínio funcional da conectividade da rede

como um todo e heterogeneidade de sinais. Por isso, o remodelamento do SNCI tem papel importante na gênese de arritmias e na progressão para a insuficiência cardíaca (RAJENDRAN et al., 2016). Neste sentido, estudos recentes têm demonstrado que a endotelina-1 (ET-1) está envolvida no processo de remodelamento do SNCI, sendo atribuídas a ela a modulação da descarga simpática, a modulação da gênese de arritmias e o prejuízo da condução local após o IM. Acredita-se que os efeitos da ET-1 no SNCI sejam mediados via receptor A da endotelina (ET_A) por meio da regulação da via intracelular envolvendo a fosfatidil inositol 3 cinase (PI3K), proteína cinase B (Akt), glicogênio sintase cinase 3 beta (Gsk3 β) e EROs; a qual regula a expressão do fator de crescimento neural, importante estimulador do remodelamento patológico do SNCI por promover a hiperinervação simpática local (KOLETTIS et al., 2017; LEE; CHANG; LIN, 2017).

Além do prejuízo na comunicação do SNCI, o IM também causa danos aos mecanismos centrais do SNA, levando à hiperatividade simpática. Este estado de ativação simpática elevada inicia-se logo após o IM, intensificando em duas vezes a atividade dos nervos cardíacos simpáticos dentro de poucas horas após o IM, progredindo para o aumento da inervação simpática cardíaca no miocárdio remanescente cerca de 1 semana após o IM (DROBYSHEVA et al., 2013; SCHWENKE et al., 2008). Poder-se-ia pensar neste efeito como sendo benéfico, afinal o aumento da atividade simpática se traduz em aumento da frequência cardíaca, o que poderia ajudar na perfusão corporal. Porém, em longo prazo o aumento da frequência cardíaca prejudica o relaxamento, causa espessamento da parede ventricular e dilatação da câmara cardíaca (CHIU et al., 2006; NISHIUE; TSUJI; TARUMI, 1999). Portanto, a hiperatividade simpática estimula o remodelamento cardíaco mal adaptativo, tendo papel fundamental na progressão para a insuficiência cardíaca (COLUCCI et al., 2000). Ainda, no contexto da insuficiência cardíaca, aliado ao aumento da atividade cardíaca simpática ocorrem também efeitos remotos em outros órgãos, como a elevação da descarga noradrenérgica sobre os rins e sobre a musculatura esquelética, gerando ativação simpática generalizada conforme o avanço da insuficiência cardíaca (BACURAU et al., 2009; RUNDQVIST et al., 1997).

Como resultado das profundas alterações envolvendo o estresse oxidativo, inflamação, prejuízo do metabolismo do cálcio, fibrose e disfunção autonômica após o IM, o remodelamento patológico causa inicialmente alterações apenas na função

cardíaca, afetando primeiramente o VE, e causando consequentes alterações na função do ventrículo direito (VD). Porém, como exemplificado anteriormente, as alterações na função cardíaca acabam tendo efeitos remotos na função de outros órgãos, afetando o sistema cardiovascular como um todo, gerando inclusive alterações e declínio na função pulmonar e muscular esquelética.

1.2.5 Alterações na função cardiovascular

O declínio da função do VE induzido pelo infarto caracteriza-se por perda da função contrátil, com aumento da pressão diastólica final, redução da fração de ejeção e hipertrofia ventricular seguida por dilatação da câmara (CHIU et al., 2006; FRANGOIANNIS, 2015). Estas alterações estão associadas ao aumento da frequência cardíaca e a arritmias, podendo levar à morte súbita (CHIU et al., 2006; NISHIUE; TSUJI; TARUMI, 1999).

Já no VD, o grau de apoptose celular eleva-se após o IM. Esse processo é ainda mais acentuado nos casos em que a isquemia atinge, além do VE, a parede do VD (ABBATE et al., 2008). Apenas uma hora após o IM foi observado aumento tanto da pressão diastólica final quanto da pressão sistólica no VD, além de prejuízo no relaxamento isovolumétrico e redução em aproximadamente 12% na fração de ejeção e 33% na mudança de área fracional, indicando a ocorrência de disfunção sistólica e diastólica do VD (LANCASTER et al., 1989; TOLDO et al., 2011). Como consequência da perda de cardiomiócitos da parede e da disfunção do VD, é provável a ocorrência de dilatação e redução da espessura da parede. Além disso, o prejuízo simultâneo aos cardiomiócitos de ambos VE e VD contribui para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (ABBATE et al., 2008). Porém, como mencionado anteriormente, o remodelamento após o IM e a insuficiência cardíaca não envolvem apenas alterações no coração.

Pelo fato de o pulmão e o coração terem suas funções estritamente relacionadas, alterações na função cardíaca têm grande influência na função pulmonar. No estágio de insuficiência cardíaca, apenas duas semanas após o IM com área isquêmica moderada a grande, observou-se a ocorrência de remodelamento pulmonar mal adaptativo. O remodelamento pulmonar após o IM envolve alterações como a congestão pulmonar, hipertensão pulmonar, síndrome respiratória restritiva e fibrose pulmonar (CHABOT et al., 2011).

Como é de se esperar, tais alterações no coração e na função pulmonar são associadas a alterações mal adaptativas vasculares, de forma que no estágio de insuficiência cardíaca devido ao IM, ocorre disfunção endotelial periférica, caracterizada por prejuízo no relaxamento do vaso em resposta a acetilcolina. Este prejuízo progressivo na capacidade de dilatação do vaso em resposta à acetilcolina se deve a redução da liberação, assim como ao aumento na degradação, do NO. A gênese desse processo está associada ao aumento na produção vascular de $O_2^{\bullet-}$ e redução na atividade da SOD extracelular (INDIK; GOLDMAN; GABALLA, 2001; ULU et al., 2009). Como resultado, este contexto leva à vasoconstrição periférica e prejuízo da perfusão tecidual.

A redução da capacidade circulatória afeta órgãos como a musculatura esquelética, e é um fator chave para o decréscimo da capacidade de trabalho do músculo esquelético, reduzindo assim a condição física do indivíduo. De fato, em pacientes com insuficiência cardíaca, a maior descarga simpática durante o exercício reduz o fluxo sanguíneo das pernas, aumenta a glicólise muscular e reduz a eficiência muscular, interferindo na performance física (LANG et al., 1997). Além disso, a vasoconstrição excessiva devido a hiperatividade simpática crônica prejudica a dilatação arteriolar muscular, altera o estado metabólico, limita o suprimento de oxigênio ao músculo esquelético e leva à atrofia muscular (BACURAU et al., 2009; LANG et al., 1997).

Desta forma, o prejuízo à função vascular, em conjunto aos prejuízos na musculatura esquelética, na função pulmonar e do coração acaba por limitar progressivamente a capacidade física global do indivíduo após a ocorrência de IM, podendo inclusive limitar a habilidade de realização de tarefas diárias (WELSCH et al., 2008). Por este motivo, torna-se necessário o desenvolvimento de tratamentos alternativos que objetivem amenizar ou reverter os danos que ocorrem após o infarto. A prática de exercício físico, combinado com o tratamento farmacológico de escolha após o IM traz efeitos benéficos, sendo capaz de melhorar a capacidade funcional e proporcionando melhora da qualidade de vida de pacientes após a ocorrência de IM (PEIXOTO et al., 2015).

1.3 Papel do treinamento físico após o IM

Após o IM, as principais metodologias utilizadas para atenuar os danos causados pelo evento isquêmico incluem terapia de reperfusão, tratamento com fármacos, transplante de coração e transplante de células progenitoras da medula óssea (LI et al., 2017; PERRELLI; PAGLIARO; PENNA, 2011; RAJASINGH et al., 2011).

A associação entre o tratamento farmacológico e terapias coadjuvantes é altamente indicada e benéfica no período pós infarto. Neste sentido, o treinamento físico é utilizado como terapia coadjuvante, sendo uma alternativa validada e de escolha após o IM e também na insuficiência cardíaca (GARY et al., 2012; HAYKOWSKY et al., 2011; KARGARFARD; ROUZBEHANI; BASATI, 2010). Uma única sessão de exercício físico prolongado de baixa ou moderada intensidade provoca queda prolongada na pressão arterial, no período pós-exercício. Esta queda depende da diminuição do débito cardíaco, associada à redução do volume sistólico (BARAAS et al., 2013; NEGRÃO; RONDON, 2001). As ações benéficas do treinamento físico incluem mudanças no balanço autonômico favoráveis à atividade parassimpática (DANILOWICZ-SZYMANOWICZ et al., 2013), melhora da função cardíaca pelo aumento da expressão gênica da isoforma alfa da cadeia pesada de miosina (α -MHC) e diminuição da expressão da isoforma beta da cadeia pesada da miosina (β -MHC), e aumento na fração de encurtamento (WAN et al., 2014).

Há evidências de que a prática regular de exercício físico também proporciona melhora no metabolismo de lipídios e encurta a recuperação na capacidade de realizar exercícios após infarto. Sendo assim, indivíduos ativos fisicamente apresentariam níveis séricos mais baixos de colesterol, triglicerídeos e lipoproteína de baixa densidade (LDL) e concentrações mais elevadas de lipoproteína de alta densidade (HDL) em relação a indivíduos sedentários. Essa combinação é considerada protetora, pois associa o baixo teor de lipídios e lipoproteínas, que causam malefício, à concentração elevada de HDL, responsável pela mobilização dos lipídios da parede arterial (LEE et al., 2014; ZANELLA; SOUZA; GODOY, 2007). Com relação a capacidade de realizar exercício físico, o treinamento físico restaura a massa muscular esquelética, bem como o metabolismo, o equilíbrio redox e o fenótipo das

fibras musculares esqueléticas, prevenindo ou até mesmo revertendo os danos à musculatura esquelética (BACURAU et al., 2009)

Muitos dos benefícios proporcionados pelo treinamento físico estão relacionados com a sua influência nos níveis séricos dos hormônios triiodotironina (T3), tetraiodotironina (T4) e hormônio estimulador da tireoide (TSH), que variam de acordo com o tipo e intensidade de treinamento (CILOGLU et al., 2005; HACKNEY et al., 2012a). Um estudo com pacientes com insuficiência cardíaca avançada demonstrou que o treinamento físico foi capaz de aumentar a sinalização dos hormônios da tireoide, ativando vias indutoras de hipertrofia (ADAMOPOULOS et al., 2013). Porém, em longo prazo o condicionamento físico está associado a redução da resposta hipofisária ao exercício, podendo ocorrer inclusive diminuição dos níveis plasmáticos de T3, T4, e TSH (MILLER et al., 1988; PAKARINEN; HÄKKINEN; ALEN, 1991).

Embora o treinamento físico proporcione melhora global na função cardiovascular e na musculatura esquelética, ele pode não ser aplicável nos casos mais avançados em que o indivíduo desenvolve intolerância ao exercício, sendo necessário o desenvolvimento de novos tratamentos coadjuvantes para estes casos. Neste sentido, tendo em vista os efeitos do treinamento físico sobre a sinalização dos hormônios tireoidianos, há crescente evidência de efeitos benéficos do tratamento com hormônios T3 e T4, principalmente na função cardíaca, após o IM.

1.4 Papel dos hormônios tireoidianos após o IM

Recentemente, estudos mostraram efeitos benéficos do tratamento com hormônios da tireoide sobre o estresse oxidativo e a função cardíaca após IM (DE CASTRO et al., 2014; MOUROUZIS et al., 2013; PANTOS et al., 2008). Tais efeitos incluem melhora na função do VE, como melhora da contratilidade, redução da dilatação, redução da apoptose celular, ativação das vias de sinalização da Akt/mTOR e AMPK, redução do estresse oxidativo e aumento da expressão da NO sintase (NOS) endotelial no miocárdio (CHEN et al., 2013; DE CASTRO et al., 2015, 2016; MOUROUZIS et al., 2013; PANTOS et al., 2009).

Além do VE, também foram reportados efeitos benéficos no VD e na aorta de ratos infartados. No VD, o tratamento com alta dose de hormônios T3 e T4 por 26 dias após o infarto trouxe como benefício a atenuação do estresse oxidativo, evidenciada

pela redução dos níveis de H_2O_2 e aumento da expressão e atividade da SOD. Além disso, o VD de ratos tratados com hormônios tireoidianos também apresentou maior expressão do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), indicando um possível efeito sobre a angiogênese após o infarto (CORSSAC et al., 2016). De forma similar, o tratamento com T3 e T4 por 12 dias após o infarto atenuou o estresse oxidativo na aorta por meio de redução da atividade da NADPH oxidase e da formação de espécies reativas de oxigênio e aumentou a expressão dos receptores de hormônio tireoidiano do tipo alfa e beta, assim como a expressão do VEGF e fator 1 alfa induzido por hipóxia (HIF-1 α) (ORTIZ et al., 2016).

Ainda há grande debate com relação a dosagem hormonal, bem como o tempo de tratamento adequado após o IM. Porém, pode-se observar que os estudos de tratamento de curto prazo, geralmente com doses mais altas, embora proporcionem benefícios na função cardíaca, tanto do VE quanto do VD, e também alterações vasculares benéficas, trazem também efeitos adversos. Tais efeitos incluem o aumento dos níveis séricos de T3, T4 e/ou redução de TSH, níveis séricos aumentados da proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) e aumento da frequência cardíaca, sendo os dois últimos considerados fatores independentes ligados ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca e, portanto, a um pior prognóstico após o IM (BÖHM et al., 2010; CHEN et al., 2013; CORSSAC et al., 2016; DE CASTRO et al., 2016; JENEI et al., 2013). Neste sentido, estudos mais recentes utilizando doses hormonais mais baixas e maior tempo de tratamento após o IM tem demonstrado efeitos benéficos sobre a função cardíaca, contudo sem causar efeitos adversos, seja nos níveis dos hormônios tireoidianos ou na a frequência cardíaca, portanto proporcionando efeito protetor contra disfunção e arritmias cardíacas (RAJAGOPALAN et al., 2016, 2017).

Embora os estudos citados variem com relação a utilização hormonal (apenas T3 ou T4, ou doses combinadas de ambos), a dose (alta ou mais baixa), ao tempo de tratamento (curto e longo prazo) e a administração do mesmo (intraperitoneal, por via oral na ração ou por gavagem), todos fornecem evidências consistentes no que diz respeito a melhora funcional após o IM. No entanto, não se sabe se os efeitos benéficos proporcionados pelo tratamento com hormônios tireoidianos após o infarto realmente representam uma alternativa ou um tratamento coadjuvante clinicamente aplicável. Portanto torna-se de grande importância a realização de estudos

comparativos entre o tratamento com hormônios da tireoide e as atuais metodologias de escolha como tratamento coadjuvante após o IM, a fim de prover evidências com relação a sua real aplicabilidade. Foi pensando nisso que o presente estudo foi desenhado e executado.

2 JUSTIFICATIVA

O IM é isoladamente a causa líder de mortes no mundo, e sua incidência aumenta a cada ano. Cerca de 30% dos sobreviventes ao IM sofrem diversas alterações como parte do processo de remodelamento cardíaco patológico, levando ao declínio progressivo na função cardiovascular e na qualidade de vida no período pós infarto. Este remodelamento com o passar do tempo leva à insuficiência cardíaca, causando aumento da morbidade e da mortalidade após IM. Para retardar ou reverter este processo, é de fundamental importância o desenvolvimento de alternativas de tratamento que promovam melhora na qualidade de vida dos pacientes no período pós infarto.

O papel benéfico tanto do treinamento físico quanto dos hormônios da tireoide na função cardiovascular é bem aceito, porém ainda não existem estudos comparando estas duas alternativas de tratamento a fim de verificar se uma delas seria mais adequada do que a outra como tratamento coadjuvante em pacientes infartados. Ainda, devido às consequências do IM, a prática de exercício físico pode não ser tolerada, e nestes casos o tratamento com hormônios T3 e T4 poderia ser uma alternativa temporária para melhorar a capacidade física global e promover tolerância ao exercício.

3 HIPÓTESE

1. O tratamento com os hormônios T3 e T4 proporciona benefícios na função cardiovascular, os quais são semelhantes àqueles alcançados por meio do treinamento físico aeróbio; portanto, poderia ser utilizado como alternativa ao treinamento físico quando há intolerância ao exercício.
2. O tratamento com hormônios T3 e T4 aumenta a tolerância ao exercício não apenas pela melhora da função cardiovascular, mas também em parâmetros pulmonares e musculatura esquelética mediante “controle remoto”.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

O principal objetivo nesta tese foi comparar os efeitos do tratamento com hormônios T3 e T4 com os efeitos benéficos proporcionados pelo treinamento físico aeróbio em esteira no longo prazo (9 semanas) após a indução de IM, verificando sua modulação sobre parâmetros cardiovasculares, pulmonares e da musculatura esquelética.

4.2 Específicos

- I. Este estudo buscou comparar os efeitos do tratamento com hormônios T3 e T4 com aqueles proporcionados pelo treinamento físico em ratos Wistar após o infarto induzido cirurgicamente, avaliando os seguintes parâmetros no VE 74 dias após o IM:
 - **Funcionais:** Ecocardiografia 48 horas após a indução de IM e após o fim do período de tratamento (74 dias após a indução de IM); e Hemodinâmica após o fim do período de tratamento;
 - **Morfométricos:** Índices de hipertrofia cardíaca do coração e VE após o fim do período de tratamento;
 - **Bioquímicos:** Avaliação do estresse oxidativo, mediante a análise do conteúdo de espécies reativas (total de EROs, H_2O_2) e lipoperoxidação (TBARS), e enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GSHPx);
 - **Expressão proteica:** A expressão de proteínas de sinalização hipertrófica e o manejo do cálcio por western blot (p-Akt, t-Akt, p-Gsk3 β , t-Gsk3 β , PGC1- α , HSP70, SERCA 1/2/3, p-fosfolambam, fosfolambam, MyH 1/2/4/6);
 - **Histológicos:** Análise histológica de fibrose.
- II. Este estudo buscou também comparar os efeitos do tratamento com hormônios T3 e T4 com aqueles proporcionados pelo treinamento físico em ratos Wistar após o infarto induzido cirurgicamente, sobre os seguintes parâmetros sistêmicos após o infarto:

- **Funcionais:** Análise da modulação autonômica por meio de cateterismo da artéria femoral;
- **Bioquímicos:** Os níveis plasmáticos de T3 e T4 após o fim do período de tratamento.

III. Este estudo buscou ainda comparar os efeitos do tratamento com hormônios T3 e T4 com aqueles proporcionados pelo treinamento físico em ratos Wistar após o infarto induzido cirurgicamente, sobre os seguintes parâmetros no parênquima pulmonar após o infarto:

- **Morfométricos:** Índices de hipertrofia e congestão pulmonar após o fim do período de tratamento;
- **Bioquímicos:** A participação do estresse oxidativo, mediante a análise do conteúdo de espécies reativas (H_2O_2), e defesas antioxidantes (grupos sulfidrilas); e o conteúdo de glicogênio;
- **Histológicos:** Análise de presença de macrófagos e infiltrado inflamatório.

IV. Por fim, este estudo buscou comparar os efeitos do tratamento com hormônios T3 e T4 com aqueles proporcionados pelo treinamento físico em ratos Wistar após o infarto induzido cirurgicamente, avaliando os seguintes parâmetros no músculo gastrocnêmio após o infarto:

- **Morfométricos:** Índices de hipertrofia após o fim do período de tratamento;
- **Bioquímicos:** A participação do estresse oxidativo, mediante a análise do conteúdo de espécies reativas (H_2O_2), e defesas antioxidantes (grupos sulfidrilas); e conteúdo de glicogênio;
- **Histológicos:** Análise de hipertrofia

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Considerações Éticas

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) com o protocolo número 29521 (comprovante disponível no Anexo I), e desenvolvido em Laboratórios do Departamento de Fisiologia e do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da UFRGS. Todos os procedimentos desse estudo foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal - CONCEA.

5.2 Amostra e desenho experimental

Foram utilizados 40 ratos Wistar machos. Os animais foram entregues pelo Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS com peso médio de 150 ± 15 gramas (32 dias de idade). Durante todo o período experimental (11 semanas), os animais permaneceram alojados no Biotério Setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) no Departamento de Ciências Morfológicas da UFRGS, sendo mantidos em caixas plásticas de 340 x 200 x 410 mm, com quatro ratos cada, com grade alta e assoalho recoberto com serragem. Os animais receberam ração e água à vontade e foram mantidos em temperatura de 22°C e ciclo de 12 horas luz/ 12 horas escuro.

Os animais passaram por um período de 72 horas de adaptação ao biotério, seguido por 5 dias de adaptação a esteira. Após este período, os mesmos foram submetidos à cirurgia de indução de IM (32 animais) ou cirurgia SHAM (8 animais), recebendo analgesia apropriada (Tramadol 12,5 mg/kg subcutâneo e 1 gota de dipirona por via oral, 12/12h por 2 dias). Dos 32 animais submetidos ao IM, 4 morreram durante a cirurgia. 48 horas após a cirurgia, os animais sobreviventes, inclusive os do grupo SHAM, passaram por avaliação ecocardiográfica da função cardíaca do VE, tendo como objetivo principal verificar a porcentagem de área de infarto em cada animal. Quatro animais submetidos a indução de IM apresentaram área de infarto próxima de 20% e foram excluídos do estudo. Os animais foram então divididos aleatoriamente nos 4 seguintes grupos, com n de 8 animais por grupo:

1. SHAM – Grupo submetido à cirurgia SHAM e que recebeu apenas veículo por gavagem.
2. IM – Grupo submetido à cirurgia de indução de IM e que recebeu apenas veículo por gavagem.
3. IME – Grupo submetido à cirurgia de indução de IM e que realizou o protocolo de treinamento físico moderado em esteira e recebeu apenas veículo por gavagem.
4. IMH – Grupo submetido à cirurgia de indução de IM e que recebeu solução composta por hormônios T3 e T4 por meio de gavagem.

As intervenções (Treinamento físico ou Tratamento com hormônios T3 e T4, bem como a administração de veículo) iniciaram uma semana após a cirurgia e tiveram duração de 9 semanas, totalizando 11 semanas ou 81 dias de protocolo experimental. Um resumo ilustrativo do desenho experimental encontra-se na Figura 1.

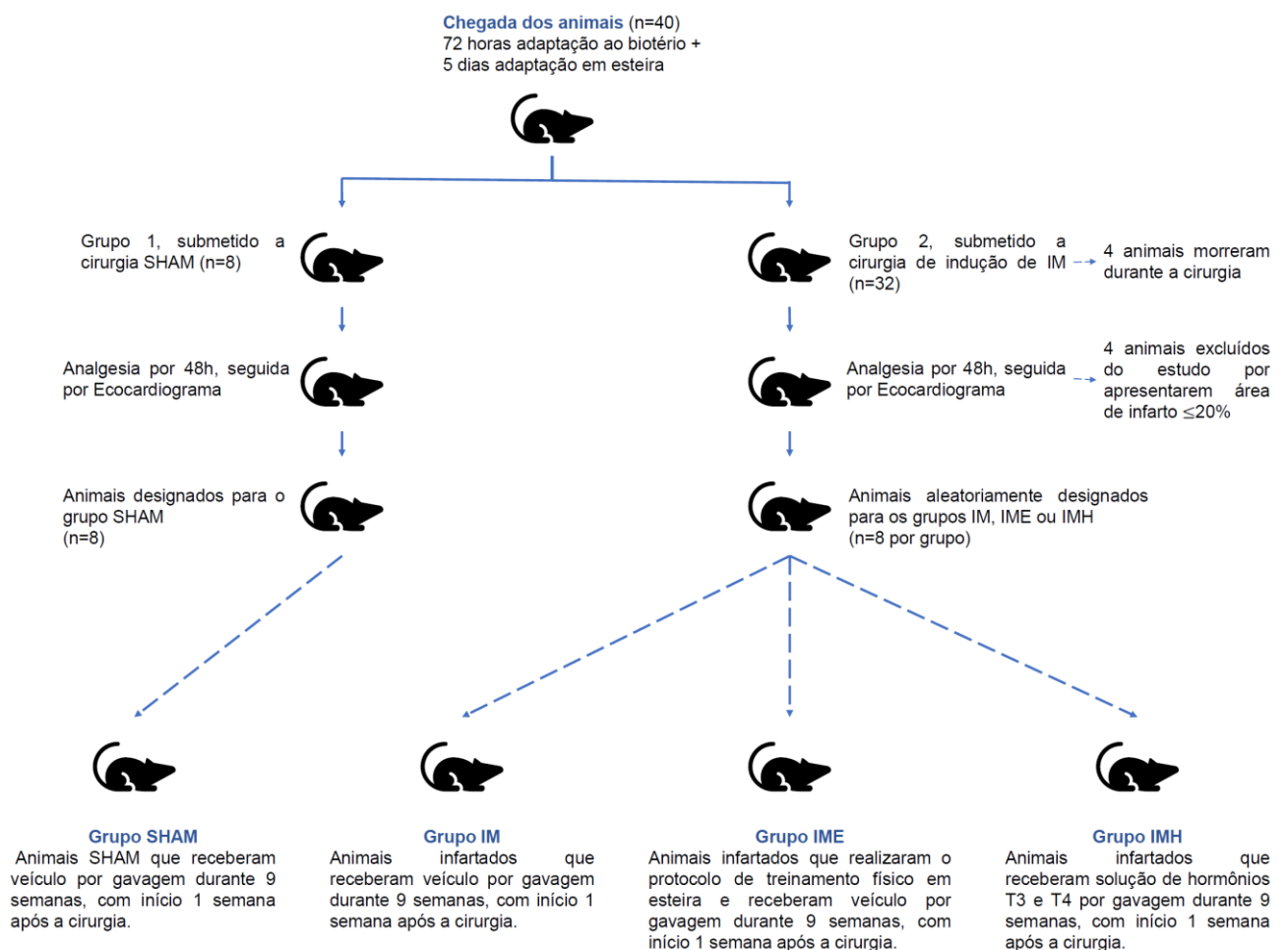


Figura 1. Ilustração do desenho experimental e divisão de grupos do estudo

O peso dos animais foi mensurado semanalmente no decorrer do estudo. Após o fim do protocolo experimental, todos os animais foram anestesiados (quetamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, intraperitoneal) e tiveram sua função cardíaca avaliada por meio de ecocardiografia e cateterismo do VE. Também foi avaliada a modulação autonômica central e vascular e o índice de sensibilidade barorreflexa por meio do cateterismo da artéria femoral. Após, foi coletado sangue em tubo heparinizado, diretamente do cateter inserido no VE e procedeu-se a eutanásia por sobrecarga anestésica (quetamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, intraperitoneal), confirmada por deslocamento cervical. Em seguida, foram coletados o coração, pulmão, gastrocnêmio, fígado e tíbia.

A tíbia teve seu comprimento mensurado e foi descartada. O coração foi pesado e separado em VE e VD, os quais também foram individualmente pesados. Após a pesagem, a área de infarto do VE foi descartada, e o VD e VE remanescente foram congelados em nitrogênio líquido. O pulmão foi pesado e separado em lado direito e esquerdo. O lado direito foi utilizado para análise de congestão pulmonar e o esquerdo foi colocado em nitrogênio líquido. O gastrocnêmio foi pesado e imediatamente imerso em nitrogênio líquido. Os órgãos foram armazenados em freezer a -80°C. O fígado foi utilizado para análise de congestão hepática. Foram então realizadas medidas bioquímicas, moleculares e histológicas no VE, que juntamente com os dados morfofuncionais, foram utilizados para a construção dos artigos 1 e 2. Também foram realizadas medidas bioquímicas no VD, pulmão e gastrocnêmio. O pulmão e o gastrocnêmio foram também submetidos à análise histológica.

5.3 Cirurgia SHAM e de indução de IM

Os procedimentos cirúrgicos para a cirurgia de indução de IM ou para a cirurgia SHAM foram realizados de forma similar a descrita por Johns & Olson (JOHNS; OLSON, 1954).

Os animais foram submetidos a cirurgia SHAM ou ao infarto com peso médio de 200±10 gramas. Para a indução do IM, cada animal foi anestesiado (quetamina - 90mg/kg i.p. e xilazina -10mg/kg i.p.), teve o tórax depilado e foi posicionado deitado sobre o dorso em mesa cirúrgica, e mantido aquecido com a ajuda de uma luminária.

Em seguida, o animal foi entubado por meio de inserção de cateter orotraqueal e submetido à ventilação mecânica (com ciclo de 60 respirações por minuto e volume de 10 ml/kg). Foi realizada uma incisão na pele, próxima a linha axilar esquerda, os músculos foram divulsionados para a visualização das costelas, seguida por incisão no 3º espaço intercostal, por meio da qual a cavidade torácica foi aberta com auxílio de um afastador de tórax. Em seguida o coração foi localizado e o epicárdio foi rompido. O infarto foi então realizado por oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda, por meio de ponto cirúrgico (fio 6-0). Em seguida, o espaço intercostal foi suturado para fechamento do tórax (fio 5-0), e o excesso de ar foi retirado da cavidade torácica utilizando uma seringa com agulha 25x0,8 mm. A respiração do animal foi então observada e o mesmo foi extubado quando capaz de respirar sem auxílio de ventilação mecânica. Para os animais dos grupos SHAM, foi realizado todo o procedimento cirúrgico acima descrito, excetuando a oclusão da artéria coronária. Na Figura 2 são apresentadas imagens do coração de um animal SHAM (A) e de um animal infartado (B), onde é possível visualizar a região da artéria coronária onde é feita a oclusão.

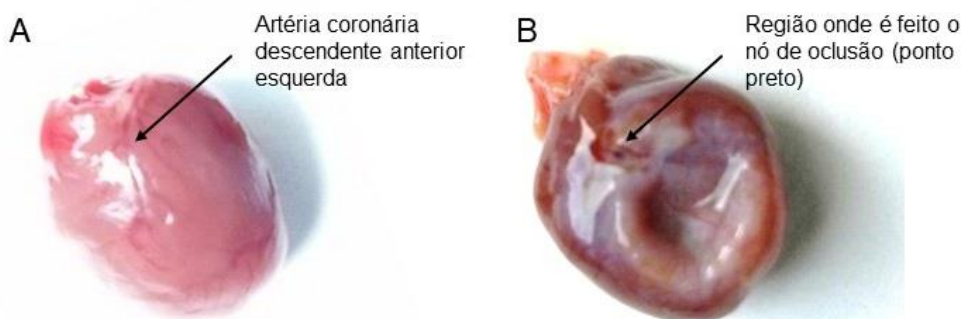


Figura 2. Imagens de coração submetido a cirurgia SHAM ou a de indução de IM. A - Coração de um rato SHAM coletado ao final do estudo, onde é possível visualizar a artéria coronária descendente anterior esquerda e suas ramificações (indicada pela seta). B – Coração de um rato infartado, onde é possível visualizar a região onde é feita a oclusão da artéria (indicada pela seta), bem como a área de infarto (região esbranquiçada).

Após o procedimento cirúrgico, os animais passaram por um período de recuperação de 48 horas, no qual receberam analgesia com Tramadol (12,5mg/kg, s.c., 12/12 horas), associado a Dipirona (200mg/kg, v.o., 12/12 horas), iniciando logo

após acordarem da cirurgia, visando minimizar a dor e o desconforto no período pós-operatório.

5.4 Ecocardiografia

Após 48 horas da realização da cirurgia, os animais foram anestesiados com quetamina (90mg/kg, i.p.) e xilazina (10mg/kg, i.p.), posicionados em decúbito lateral esquerdo em uma maca para ratos e submetidos à avaliação ecocardiográfica transtorácica, com obtenção de imagens em modo bidimensional e em modo M, utilizando um transdutor S12-13 (Philips, Andover, MA, USA). Todos os parâmetros foram avaliados nos níveis basal, medial e apical, assumindo a média dos três níveis como o valor final.

Na ecocardiografia foram avaliados os seguintes parâmetros da função ventricular esquerda: perímetro total, perímetro infartado, área de infarto, área transversal na sístole e na diástole, comprimento paraesternal na sístole e na diástole, fração de ejeção, fração de encurtamento, mudança na área fracional, espessura da parede posterior na sístole e diástole, diâmetro sistólico e diastólico final, volume sistólico e diastólico final, débito sistólico, débito cardíaco, frequência cardíaca, e índice de estresse de parede. Todos os dados funcionais foram calculados usando fórmulas previamente padronizadas na literatura (NOZAWA et al., 2006; PERON et al., 2006; TAVARES et al., 2010). A avaliação ecocardiográfica foi realizada novamente ao final do protocolo experimental (74 dias após a cirurgia).

5.5 Intervenções terapêuticas realizadas após o IM

5.5.1 Protocolo de treinamento físico aeróbio em esteira

As sessões de treinamento físico foram realizadas em esteira adaptada para ratos (Imbramed TK-01 – Figura 3). Todos os animais foram adaptados à esteira por 5 dias, com caminhada durante 15 minutos em velocidade de 0,3 km/h antes da indução de infarto, e uma nova adaptação foi iniciada 1 semana após a cirurgia. Após, foi realizado teste de esforço máximo (TEM), de acordo com o estabelecido por Rodrigues e Batista (BATISTA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007). O TEM consistiu em teste individual, iniciando a uma velocidade de 0,3 km/h, sendo a

velocidade aumentada em 0,3 km/h a cada 3 minutos, até a exaustão do animal. Com base nos resultados do TEM, foi feita a prescrição do treinamento físico, apenas para os animais do grupo IME. Os animais do grupo IME então iniciaram o protocolo de exercícios aeróbios, composto de cinco sessões semanais, realizadas sempre no início da manhã, durante 56 dias (8 semanas), conforme previamente descrito na literatura (BATISTA et al., 2007; WANG et al., 2010; XU et al., 2008). A duração da sessão e a intensidade aumentaram gradativamente até atingir 60 minutos e 40% da velocidade do TEM (aproximadamente 60% do VO_2 máximo), respectivamente. Na quarta semana de treinamento foi realizado outro TEM, com a finalidade de verificar a capacidade aeróbia dos diferentes grupos, e ajustar a carga de treinamento do grupo IME. Ao final do protocolo, todos os grupos (SHAM, IM, IME e IMH) foram submetidos a um TEM final, para verificar a capacidade aeróbia dos diferentes grupos. Para isso, os grupos SHAM, IM e IMH passaram por um novo período de 5 dias de adaptação a esteira, antes da realização de cada TEM. Após o TEM final, todos os animais permaneceram 24 horas em descanso, antes da realização da análise ecocardiográfica final. O desenho do protocolo de treinamento físico do grupo IME está resumido na Tabela 1. A Tabela 2 mostra o protocolo detalhado de treinamento.



Figura 3. Imagem da esteira utilizada durante o protocolo experimental. Foi utilizada esteira específica adaptada para ratos, e os mesmos realizaram o treinamento em raia individual.

Tabela 1. Protocolo de treinamento resumido

Semana	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Tempo (minutos)	Adaptação	30	40	50	60	60	60	60	60
Intensidade (% do TEM)		20	20	20	20	25	30	40	40

Tabela 2. Protocolo de treinamento detalhado.

Semana	Dias	Aquecimento		Principal		Recuperação ativa	
		Velocidade (km/h)	Tempo (min)	Velocidade (km/h)	Tempo (min)	Velocidade (km/h)	Tempo (min)
1	1-5	0,3	10	0,4	10	0,3	10
	6-7	Descanso					
2	8-9	0,3	20	0,4	13	0,3	2
	10-12	0,3	20	0,4	15	0,3	5
	13-14	Descanso					
3	15-16	0,3	30	0,4	12	0,3	3
	17-19	0,3	30	0,4	15	0,3	5
	20-21	Descanso					
4	22-23	0,3	40	0,4	12	0,3	7
	24-25	0,3	40	0,4	13	0,3	7
	26	TEM					
	27-28	Descanso					
5	29-30	0,3	40	0,4	17	0,3	3
	31	0,3	35	0,4	22	0,3	3
	32	0,3	30	0,4	25	0,3	5
	33	0,3	25	0,4	30	0,3	5
	34-35	Descanso					
6	36-37	0,3	17	0,4 0,5	35 3	0,3	5
	38	0,3	13	0,4 0,5	39 3	0,3	5
	39	0,3	10	0,4 0,5	42 3	0,3	5
	40	0,3	8	0,4 0,5	45 3	0,3	4
	41-42	Descanso					
	43	0,3	3	0,4 0,5	50 3	0,3	4
7	44	Descanso					
	45	0,3	3	0,4 0,5	55 1	0,3	1
	46	0,3	1	0,4 0,5	55 3	0,3	1
	47	0,3	1	0,4 0,5 0,4	20 10 28	0,3	1
	48	0,3	1	0,4 0,5 0,4	20 15 23	0,3	1
	49	Descanso					
	50	0,3	1	0,4 0,5 0,4	19 20 19	0,3	1
	51	0,3	1	0,4 0,5 0,4	17 25 16	0,3	1
8	52	0,3	1	0,4 0,5 0,4	14 30 14	0,3	1
	53	Descanso					
	54	TEM					
	55-56	Descanso					

5.5.2 Administração de solução de hormônios T3 e T4 por meio de gavagem

O tratamento com hormônios da tireoide foi iniciado uma semana após a realização da cirurgia. Os animais do grupo MIH receberam dose intragástrica diária de hormônios T3 ($1.2 \mu\text{g}/100\text{g}$ de peso corporal) e T4 ($4.8 \mu\text{g}/100\text{g}$ de peso corporal) por gavagem, de segunda a sexta feira, sempre no início da manhã, até o fim do protocolo experimental (74 dias após a cirurgia de IM). Os hormônios eram preparados em sala escura, dissolvidos em $300\mu\text{L}$ de NaOH 1N e diluídos em salina com pH final de 7.0. Durante o mesmo período, os animais dos grupos controles (SHAM e IAM) receberam apenas o veículo ($300\mu\text{L}$ de NaOH 1N diluídos em salina com pH final de 7.0) por gavagem (Figura 3). As doses foram administradas de acordo com estudos prévios, com o objetivo de proporcionar uma ação cardioprotetora, com o mínimo de efeitos adversos, sendo considerada uma taxa de absorção gastrointestinal de 50 a 75% da dose administrada (PANTOS et al., 2007, 2008).



Figura 4. Administração de dose intragástrica por gavagem.

5.6 Hemodinâmica do ventrículo esquerdo

Após a avaliação ecocardiográfica final, os animais foram submetidos à avaliação da função do VE por meio de cateterismo. Para isso, a artéria carótida direita foi isolada e submetida a uma pequena incisão com tesoura oftálmica a 45° de inclinação, onde um cateter feito de tubo de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsipanny, NJ, EUA), previamente soldado a um tubo Tygon® foi implantado e introduzido até o átrio e VE. A pressão ventricular sistólica e diastólica final esquerda e suas respectivas derivadas de contratilidade máxima e mínima foram então monitoradas utilizando o software Windaq, com frequência de amostragem de 2 kHz (Dataq Instruments, Inc., Akron, Ohio, EUA). As ondas foram detectadas por um transdutor de pressão (Strain-Gauge – Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155; Houston, Texas – EUA) ligado a um amplificador de sinais (Pressure Amplifier HP 8805C). Todo o procedimento foi realizado em sala apropriada, com o mínimo possível de ruídos. A frequência respiratória e reflexos do animal foram observados durante todo o procedimento, sendo administrado 1/3 da dose anestésica total quando necessário.

5.7 Hemodinâmica vascular e análise espectral

5.7.1 Procedimento para avaliação hemodinâmica

Após a hemodinâmica do VE, foi feito o cateterismo da artéria femoral. A artéria femoral direita foi isolada, e foi feita uma incisão (ângulo de 45° utilizando tesoura oftálmica) na mesma, através da qual foi inserido um cateter de polivinila (P-10, Clay Adams, USA), previamente soldado a um tubo Tygon® e preenchido com salina e heparina (1% Lique mine 5000UI). As ondas de pressão foram então monitoradas durante 2 minutos, sendo detectadas por um transdutor de pressão (Strain-Gauge Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155; Houston, Texas) conectado a um amplificador de pressão (HP 8805C, Hewlett Packard). Os dados foram gravados pelo software Windaq, com frequência de amostragem de 2 kHz (Dataq Instruments, Inc., Akron, Ohio, EUA). Todo o procedimento foi realizado em sala apropriada, com o mínimo possível de ruídos. A frequência respiratória e reflexos do animal foram

observados durante todo o procedimento, sendo administrado 1/3 de dose anestésica total quando necessário.

5.7.2 Análise das ondas e análise espectral

Para a análise das ondas de cada animal, sequências estáveis de 300 batimentos foram escolhidas aleatoriamente. As sequências escolhidas foram então utilizadas para a quantificação da pressão arterial sistólica (PAS, mmHg), pressão arterial diastólica (PAD, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg), e frequência cardíaca (FC).

A análise espectral foi realizada para avaliar a modulação autonômica, a sensibilidade barorreflexa, e a modulação pelo sistema renina-angiotensina, conforme previamente descrito na literatura (CASALI; CASALI, 2007; MALLIANI et al., 1991; PAGANI et al., 1988). Foram considerados dois componentes espectrais: o de baixa frequência (0,20 a 0,75 Hz), e o de alta frequência (0,75 a 4,00 Hz), os quais foram expressos em unidades absolutas e normalizadas, sendo o de baixa frequência correspondente à modulação simpática e o de alta frequência correspondente à modulação parassimpática.

Foram avaliados dois domínios: a variabilidade da frequência cardíaca, e a variabilidade da pressão arterial. Na variabilidade da frequência cardíaca foram avaliados: variabilidade da frequência cardíaca, frequência central do componente simpático da variabilidade da frequência cardíaca, frequência central do componente parassimpático da variabilidade da frequência cardíaca, razão entre componente simpático e parassimpático. Na variabilidade da pressão arterial foram avaliados: variabilidade da pressão arterial sistólica, frequência central do componente simpático na variabilidade da pressão arterial, frequência central do componente parassimpático na variabilidade da pressão arterial, componentes de baixa, alta, e muito baixa frequência da variabilidade da pressão arterial, sendo o componente de muito baixa frequência correspondente a modulação pelo sistema renina-angiotensina. A sensibilidade barorreflexa foi avaliada pelo índice alfa de baixa frequência.

5.8 Coleta de sangue, eutanásia e coleta de tecidos

Após a hemodinâmica vascular, foi efetuada coleta de 1,5 a 2 ml de sangue em tubo heparinizado, diretamente pelo cateter inserido no VE, para posterior dosagem dos hormônios T3, T4 e TSH. Imediatamente após a coleta, os animais foram eutanasiados por meio de sobrecarga anestésica (quetamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg), seguida por deslocamento cervical. Foram coletados os seguintes órgãos: coração, pulmão, fígado, gastrocnêmio e tíbia. Os órgãos foram utilizados para medidas morfométricas, bioquímicas e de estresse oxidativo, histológicas e de expressão proteica por Western blot.

5.9 Morfometria

Na análise morfométrica foram avaliados os índices de hipertrofia do coração, VE, VD, pulmão e gastrocnêmio, e também os índices de congestão hepática e pulmonar. Para os índices de hipertrofia foi considerado o valor da razão entre o peso do órgão (mg) e o peso corporal (g), bem como o valor da razão entre o peso do órgão (mg) e o comprimento da tíbia (mm) (HU et al., 2003; YIN et al., 1982). Os índices de congestão pulmonar e hepática foram obtidos pela razão entre o peso úmido e o peso seco (g/g).

5.10 Análises bioquímicas e de estresse oxidativo

5.10.1 Dosagem hormonal no plasma

Para a dosagem hormonal, as amostras de sangue coletado em heparina foram centrifugadas durante 15 minutos a 2415 x *g* em centrífuga refrigerada a 4°C (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24). Em seguida, o plasma foi aliquoteado e enviado ao laboratório Labvitrus (Porto Alegre, RS) para análise. Os hormônios T3, T4 e TSH foram então quantificados por imunoabsorção enzimática, utilizando o equipamento BRIO – Radim e kits ELISA específicos da marca IBL internacional (Hamburgo, Alemanha).

5.10.2 Dosagem de glicogênio no pulmão e no músculo gastrocnêmio

A dosagem de glicogênio foi realizada tendo como base a técnica descrita por Van Handel (VAN HANDEL, 1965). Para cada amostra de tecido (100 mg), foram adicionados 500 µL de hidróxido de potássio (KOH 30%) e as amostras foram colocadas em banho-maria a 100°C durante 60 minutos para destruição da estrutura tecidual. Em seguida, adicionou-se 50 µL de sulfato de sódio (Na_2SO_4 35%) e 1ml de etanol absoluto, para permitir a precipitação do polímero. Após, as amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 672 $\times g$. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em água destilada. Foi adicionado 1 ml de etanol absoluto e realizada nova centrifugação. Para a hidrólise do glicogênio em glicose livre, foram adicionados 300µL de água destilada e 300µL de HCl (4M). As amostras foram novamente mantidas em banho-maria por 60 minutos e neutralizadas ao fim do processo com 300 µL de carbonato de sódio (Na_2CO_3 2M). Por fim, foi feita a reação de determinação de glicose utilizando o kit colorimétrico Glicose-Labtest e realizada a leitura em espectrofotômetro em 505 nm. Os resultados foram expressos como mg/ g de tecido.

5.10.3 Preparação do homogeneizado de tecido para análises de estresse oxidativo

Para a preparação do homogeneizado, as amostras foram descongeladas, sendo retirada uma amostra representativa de aproximadamente 50 mg para cada análise. Em seguida, o volume pesado foi homogeneizado em cloreto de potássio (KCl) 1,15% (500 µl/ 50mg de tecido) e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF, 5 µl/ 50mg de tecido), usando um homogeneizador Politron em um pulso de 40 segundos. As amostras foram então centrifugadas por 20 minutos a 2415 $\times g$ e em temperatura de 4°C, e o sobrenadante foi utilizado para as análises. Foram preparados homogeneizados do VE (sem a cicatriz), VD, pulmão e gastrocnêmio. Para o homogeneizado do gastrocnêmio, juntamente ao KCl e ao PMSF, foram também adicionados 50 µl de Triton X para cada 50mg de tecido. As proteínas presentes no homogeneizado foram quantificadas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) e utilizadas para normalizar os resultados.

5.10.4 Avaliação da concentração total de espécies reativas de oxigênio

O método consiste na mensuração da fluorescência produzida pela oxidação da 2, 7-diclorofluoresceína (DCFH) pelas espécies reativas de oxigênio presentes no homogeneizado de VE. Os resultados foram expressos em pmol de DCF formado/ mg de proteína (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992).

5.10.5 Quantificação de peróxido de hidrogênio

O H_2O_2 foi quantificado nos homogeneizados de VE, VD, pulmão e gastrocnêmio. Este método baseia-se na oxidação do vermelho de fenol pelo peróxido de hidrogênio mediado pela peroxidase de rabanete, resultando num produto que absorve em 610 nm. Os resultados foram expressos em nmoles de H_2O_2 por mg de proteína (PICK; KEISARI, 1980).

5.10.6 Quantificação de lipoperoxidação

A lipoperoxidação foi avaliada no VE por meio da quantificação da reação entre os produtos da lipoperoxidação e o ácido tiobarbitúrico (TBA) (BUEGE; AUST, 1978). Os resultados foram descritos como nmol de substâncias reativas ao TBA (TBARS)/ mg de proteína.

5.10.7 Quantificação dos grupos sulfidrilas

Os compostos sulfidrilas foram mensurados em homogeneizados de pulmão, VD e gastrocnêmio, por meio do método espectrofotométrico de Ellman, modificado por Hu et al (ELLMAN, 1959; HU et al., 1993). O método baseia-se na reação do ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) com os grupos sulfidrilas presentes na amostra, produzindo ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). Os resultados foram expressos como μ mol por mg de proteína.

5.10.8 Atividade da superóxido dismutase

A atividade da enzima SOD foi medida em homogeneizado de VE, baseando-se na reação de inibição da autooxidação do pirogalol, promovida pela SOD presente nas amostras. A reação foi mensurada a 420nm e os resultados foram expressos como unidades de SOD (USOD) por mg de proteína (MARKLUND, 1985).

5.10.9 Atividade da catalase

A atividade da CAT foi medida em homogeneizado de VE, por meio da quantificação da redução da absorbância do peróxido de hidrogênio (240nm). Os resultados foram expressos como pmoles de H₂O₂ reduzidos por minuto por mg de proteína (AEBI, 1984).

5.10.10 Atividade da glutathione peroxidase

A atividade da GSHPx foi determinada em homogeneizado de VE, medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução do disulfeto de glutathione (GSSG) à glutathione reduzida (GSH). Os resultados foram expressos em nmoles por minuto por mg de proteína (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984).

5.11 Análise histológica de fibrose do VE

A análise histológica consistiu em análise de fibrose por meio de coloração com tricrômio de Masson em lâminas de VE. Para isso, o VE (sem cicatriz) foi cortado em uma secção transversal no plano medial (medindo aproximadamente 64mm² e 2mm de espessura), fixado em solução de formalina tamponada 4%, e parafinizado. Após a parafinização, cada amostra foi fatiada em um micrótomo, obtendo secções com espessura de 3 µm, que foram fixadas em lâmina para microscópio. A seguir, as lâminas foram coradas pelo método de tricrômio de Masson (LILLIE; FULLMER, 1976; LUNA, 1978; MASSON, 1929; SHEEHAN; HRAPCHAK, 1980).

Uma vez prontas, as lâminas foram individualmente analisadas por dois patologistas, utilizando um microscópio óptico (Leica DME, Leica Microsystems Inc, Nova York, EUA). Cada lâmina foi classificada conforme a severidade da fibrose, em

grau 0 (ausência), grau 1 (baixa), grau 2 (moderada), e grau 3 (acentuada). A média de resultados dos dois patologistas foi considerada como o resultado final. As imagens representativas para cada grupo foram obtidas por uma câmera acoplada ao microscópio (EC 3 Leica Microsystems Inc, Nova York, EUA).

5.12 Análise histológica do pulmão e gastrocnêmio

A preparação histológica das amostras de pulmão e gastrocnêmio foi realizada de forma similar à do VE. Os cortes transversais de músculo gastrocnêmio e de pulmão foram imersos separadamente em formalina 4% tamponada, por 24 horas. Em seguida, as amostras foram incluídas em parafina “*overnight*”. As lâminas histológicas foram preparadas contendo cortes com 3 µm de espessura e coradas pela coloração padrão de Hematoxilina-Eosina (LILLIE; FULLMER, 1976; LUNA, 1978; MASSON, 1929; SHEEHAN; HRAPCHAK, 1980). Após, as amostras foram analisadas em microscópio óptico Opticam, modelo 0500R (Opticam Microscopy Technology, USA).

As lâminas de pulmão foram analisadas por médico patologista quanto a presença de macrófagos e de infiltrado inflamatório. O músculo gastrocnêmio foi analisado quanto a presença de hipertrofia das fibras musculares. Cada lâmina foi classificada conforme a intensidade do parâmetro analisado, em grau 0 (ausência), grau 1 (baixa), grau 2 (moderada), e grau 3 (acentuada). As imagens foram obtidas utilizando câmera fotográfica acoplada ao microscópio, modelo LOPT14003 (Opticam Microscopy Technology, USA).

5.13 Análise da expressão de proteínas por Western blot

A verificação da expressão proteica por Western blot foi realizada em homogeneizado de VE, conforme métodos descritos por Laemmli e Klein (KLEIN; KERN; SOKOL, 1995; LAEMMLI, 1970). As membranas foram processadas por imunodeteção usando-se os seguintes anticorpos primários: p-Akt, t-Akt, p-Gsk3β, t-Gsk3β, RyR, SERCA 1/2/3, p-PLB, PLB, MYH 1/2/4/6, PGC1-α, HIF1-α, HSP70 e seus respectivos anticorpos secundários (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz - CA, USA). A quantificação das bandas foi realizada utilizando o software ImageJ (National Institute of Mental Health, EUA), e os valores foram normalizados pelo método de Ponceau (KLEIN; KERN; SOKOL, 1995).

5.14 Cuidados com relação ao descarte da amostra e materiais tóxicos

Todos os procedimentos experimentais foram feitos com uso dos equipamentos de proteção individual adequados: avental, luva cirúrgica, e óculos e máscara quando necessário. O descarte de amostras, bem como de materiais tóxicos e contaminantes foi realizado conforme regras estabelecidas pela UFRGS. As carcaças dos animais mortos foram colocadas em sacos plásticos brancos e encaminhadas ao biotério setorial no ICBS - UFRGS, onde foram recolhidas por empresa terceirizada, responsável pelo serviço de coleta de materiais biológicos de descarte. Materiais tóxicos foram usados na capela e os descartes encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para sua correta eliminação.

5.15 Análise estatística

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os resultados que apresentaram distribuição normal foram analisados por ANOVA de uma via e pós-teste de Tukey, e expressos como média \pm desvio padrão da média. Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido por pós-teste para comparação entre grupos, quando aplicável, e expressos como mediana e intervalos interquartis (25, 75). Para todas as análises, foi considerada uma probabilidade de erro alfa menor ou igual que 0,05 ($P \leq 0,05$). Os cálculos estatísticos foram efetuados utilizando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 20.0. Gráficos foram elaborados utilizando GraphPad Prism 5. Ilustrações foram elaboradas utilizando PowerPoint e SMART - Servier Medical Art.

6 RESULTADOS

Os resultados estão organizados na forma de artigos completos (1 e 2), e um artigo parcialmente escrito (3), o qual contém dados complementares.

6.1 Artigo 1

Título: Long-term T3 and T4 treatment as an alternative to aerobic exercise training in improving cardiac function post-myocardial infarction.

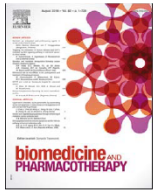
Revista: Biomedicine & Pharmacotherapy

Data de publicação: Setembro de 2017



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph

Long-term T3 and T4 treatment as an alternative to aerobic exercise training in improving cardiac function post-myocardial infarction

Rayane Brinck Teixeira^a, Alessandra Zimmer^a, Alexandre Luz de Castro^a,
Bruna Gazzi de Lima-Seolin^a, Patrick Türck^a, Rafaela Siqueira^a, Adriane Belló-Klein^a,
Pawan K. Singal^b, Alex Sander da Rosa Araujo^{a,*}

^a Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Institute of Cardiovascular Sciences, St. Boniface General Hospital Research Centre, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada

ARTICLE INFO

Keywords:

Thyroid hormones treatment
Aerobic exercise training
Cardiac function
Acute myocardial infarction
Heart failure
Contractility

ABSTRACT

Here we aimed to compare the beneficial effects of T3 and T4 hormone treatment to those provided by aerobic exercise training in Wistar rats post-myocardial infarction (MI). Rats in one group were SHAM-operated and in the other group were subjected to MI surgery. One week after surgery, the MI group animals either received T3 and T4 hormones by gavage or underwent a low intensity aerobic exercise training protocol on a treadmill, and both treatments lasted until 10 weeks after MI. Untreated SHAM-operated and MI groups were also followed for the same duration. The cardiac function was assessed by echocardiography and catheterization, followed by blood collection (to measure T3, T4, and TSH hormones), and euthanasia. The lung, liver, heart, and tibia were collected (to assess hypertrophy and congestion indices). The left ventricle homogenate (without a scar) was used for the analyses of calcium handling proteins. Results showed that enhanced cardiac function was promoted by both interventions, with infarct size reduction, increased ejection fraction, and diastolic posterior wall thickness, but no alterations in heart rate, cardiac output, or T3, T4, and TSH levels. There was a positive force-frequency relationship accompanied by increased α -MHC, as well as decreased HSP70 protein expression. In conclusion, the effects of T3 and T4 hormone treatments were similar, and in some parameters superior, to those provided by the aerobic exercise training. Thus, lower doses of thyroid hormones could be more suitable as a coadjuvant treatment after MI, as a plausible alternative for patients who are intolerant to aerobic exercise training.

1. Introduction

Acute myocardial infarction (MI) is a concerning disease worldwide. Physiological changes and pathophysiological cardiac adaptations in MI survivors can progress to heart failure, resulting in increased morbidity and mortality [1–4]. Aerobic exercise training is used as a post-MI treatment and has been reported to offer substantial beneficial effects, not only for post-MI remodeling but also for heart failure [5–10]. The beneficial actions of aerobic exercise training include an increase in the parasympathetic drive, improvement of cardiac function by increasing the alpha myosin heavy chain (α -MHC) and reducing beta myosin heavy chain (β -MHC) expression, increased fractional shortening, improved blood pressure, enhanced exercise capacity, and amelioration of lipid metabolism, muscle strength, and symptoms severity [6–8,11–14].

However, for some intolerant patients, the aerobic training is contraindicated, and the development of other coadjuvant alternatives is essential. Since many of the beneficial effects exerted by the aerobic exercise training are promoted through its influence on serum levels of triiodothyronine (T3), tetraiodothyronine (T4) and thyroid-stimulating hormone (TSH) [15–19], both short-term and long-term thyroid hormones treatments have been attempted to improve the cardiac function post-MI [20–24]. These effects include improvement in mechanical performance as well as in cardiac function (by increased α -MHC and reduced β -MHC expression), reshaping of the left ventricular chamber, increased ejection fraction, normalization of wall stress, and decreased pro-apoptotic signaling [20–22,24]. However, in most of these studies the beneficial effects provided by thyroid hormones administration are also accompanied by some adverse effects, such as increased heart rate

* Corresponding author at: Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, sala 344, CEP 90050170, Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: alex.rosa@ufrgs.br (A.S. da Rosa Araujo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bioph.2017.09.021>

Received 6 July 2017; Received in revised form 6 September 2017; Accepted 6 September 2017

0753-3322/ © 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

(HR), and T3, T4 and TSH levels, and elevated expression of heat shock protein 70 (HSP70), resulting in heart failure and increased mortality [4,25–30]. However, possible mitigation of these adverse effects by using lower doses of T3 and T4 hormones has yet to be examined.

The present study was designed to examine the effects of long-term treatment with low doses of T3 and T4 hormones compared to those of the aerobic exercise training on the cardiac function after acute MI in Wistar rats.

2. Materials and methods

2.1. Ethical approval

This study was approved by the Ethics Committee on the use of animals of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol number 29521). All procedures in this study were also in accordance with the ARRIVE guidelines, and the National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

2.2. Experimental design

Male Wistar rats (190 ± 10 g, $N = 40$) were obtained from the Center for Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Animals were kept in plastic cages (four per cage) and received water and pelleted food *ad libitum*. They were maintained under standard laboratory conditions (controlled temperature of 21 °C, 12 h light/dark cycle).

The surgery of acute MI induction was performed in 32 animals through the left anterior descending coronary artery ligation, as previously described [31]. All animals were anesthetized (ketamine 90 mg/kg and xylazine 10 mg/kg, intraperitoneally) before the surgery. Post-surgical analgesia was made using Tramadol (12.5 mg/kg, subcutaneously), and dipyrone (200 mg/kg, orally), twice a day, for 2 days. Four animals died during the surgery, and four more did not have or had less than 20% infarct area and were not included in the study. The remaining 24 ligated were randomly divided into the following groups ($n = 8$ /group): MI (acute MI), MIE (acute MI plus aerobic exercise), and MIH (acute MI plus T3 and T4 hormones). Animals in the SHAM group ($n = 8$) were subjected to SHAM surgery, without coronary artery ligation. The infarct size in the ligated animals was confirmed by echocardiographic assessment, 48 h after surgery. One week after the surgery, animals in the MIE started the aerobic exercise training protocol, and MIH rats started to receive thyroid hormones by gavage. Both interventions were always performed in the morning.

The aerobic exercise training protocol was performed on a treadmill (Imbramed KT-01) adapted for rats, five times a week for 9 weeks, beginning one week after MI surgery [9,32,33]. Animals in the MIE group were subjected to adaptation by walking for 15 min on the treadmill at a constant velocity of 0.3 km/h for four consecutive days. Duration and intensity of the exercise were gradually increased until a duration of 60 min and an intensity of 60% of the maximal oxygen consumption (VO_2 max) obtained in the maximum speed test. The intensity of 60% of VO_2 max and the protocol used at the maximum speed test were based on the studies of Rodrigues and collaborators [34], and Batista and collaborators [32]. At the end of the fourth week, another maximum speed test was done to adjust the workload.

The T3 and T4 hormone treatments consisted of intragastrical administration by gavage, five times a week, beginning one week after MI surgery. All animals of the MIH group received T3 (1.2 µg/100 g/day) and T4 (4.8 µg/100 g/day) hormones, dissolved in NaOH 1N and diluted in saline, whereas the SHAM, MI, and MIE groups received only the vehicle.

Both treatments ended 10 weeks after MI induction when all animals were weighed, anesthetized, and cardiac function parameters were assessed, followed by blood collection in heparinized tubes

(directly from the left ventricle, through a catheter). The collected blood was used for the determination of T3, T4, and TSH hormones levels by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). After blood collection, euthanasia was conducted by anesthetic overload (ketamine 90 mg/kg and xylazine 10 mg/kg, intraperitoneally) and confirmation of death was given by cervical dislocation. The heart, lung, liver, and tibia were collected and were used for morphometric analysis. After morphometric measurements, the scar of each left ventricle (LV) was removed, and the remaining LV tissue was immediately immersed in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Subsequently, each LV was homogenized and used for Western blotting analyses.

2.3. Cardiac function analysis

2.3.1. Echocardiographic assessment

Echocardiographic data were accessed at 48 h (2 days, initial) and 74 days (10 weeks, final) after surgery. Animals were anesthetized (ketamine 90 mg/kg and xylazine 10 mg/kg, intraperitoneally) and placed in left lateral decubitus position (45°). Images of the LV were obtained by transthoracic echocardiography using Philips HD7 XE ultrasound system with an L12–13 MHz transducer, in 2D and M-mode. All parameters were analyzed at basal, middle, and apical levels, and the final value was obtained by taking the average of all three levels [35,36].

Infarct size, left ventricular ejection fraction (EF), end-systolic (ESV) (ml) and end-diastolic volume (EDV) (ml), cardiac output (CO) (ml/min), left ventricular systolic and diastolic posterior wall thickness (SPWT and DPWT) (cm), and heart rate (HR) (beats/min) were measured as previously described [35–37].

2.3.2. Left ventricle catheterization assessment

Immediately after the final echocardiography, each animal was subjected to LV catheterization, which was performed as previously described [38]. Left ventricular systolic (LVSP) and end-diastolic pressure (LVEDP) and their respective derivatives ($+dP/dt$ and $-dP/dt$) were monitored using a pressure transducer (Strain-Gauge, Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155; Houston, Texas) connected to a signal amplifier (Windaq sampling frequency 1 kHz, Dataq Instruments, Inc., Akron, Ohio, USA, Pressure Amplifier HP 8805C). $+dP/dt$ -EDV ratio, which is a less load-dependent parameter of chamber contractility, was also measured [39].

2.4. Measurement of T3, T4, and TSH hormones by ELISA assay

To evaluate the plasma levels of total T3, T4, and TSH, the blood samples were centrifuged for 15 min at $2415 \times g$ in a refrigerated centrifuge at 4 °C (Sorvall RC 5B – Rotor SM 24). The plasma was separated and used for analysis. Total T3, T4, and TSH were quantified through BRIO – Radim equipment using specific ELISA assay kits from IBL International (Hamburg, Germany). Assays were conducted by Labvitrus Laboratory (Porto Alegre, RS, Brazil).

2.5. Morphometric analysis

The morphometric analysis included parameters of body weight and heart weight, cardiac hypertrophy indices, and lung and hepatic congestion. The cardiac hypertrophy index was calculated as the ratio of the total weight of heart tissue (in mg) to the length of the tibia (in mm) [40]. A second calculation was performed using the total weight of heart tissue (in mg) to the total body weight (g) ratio [41]. Pulmonary and hepatic congestion indices were obtained by the wet to dry (W/D) weight ratio (in g/g) of each organ.

2.6. Western blot analysis

Tissue homogenization, electrophoresis, and protein transference

were conducted as previously described [42]. Total proteins in homogenate were quantified by the method of Lowry et al. [43]. Fifty micrograms of protein were submitted to one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis in a discontinuous system using 8–12% (w/v) separating and stacking gels. The primary antibodies used for immunodetection were sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATPase 1, 2, and 3 (SERCA 1/2/3 – 110/100/97 kDa, respectively), phospho-phospholamban (p-PLB – 27 kDa), phospholamban (PLB – 25 kDa), ryanodine receptor (RyR – 565 kDa), myosin heavy chain 1, 2, 4 and 6 (MYH 1/2/4/6–200 kDa), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator alpha (PGC1- α – 92 kDa), hypoxia-inducible factor1-alpha (HIF1- α – 132 kDa), and heat shock protein 70 (HSP70). Anti-rabbit, anti-mouse, or anti-goat horseradish peroxidase-conjugate were used as secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The protein bands were detected using chemiluminescence and the autoradiographs generated were quantitatively measured using the ImageJ software (public domain Java image processing program, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad, CA, USA). Results were normalized by the Ponceau method [44].

2.7. Statistical analysis

Results are expressed as the mean and standard deviation (SD). The normality of the data was evaluated by the Shapiro-Wilk test. One-way ANOVA and Tukey's post hoc were used for comparisons between groups. The significance level was 5% ($P < 0.05$). All calculations were performed using SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 20.0. Graph Pad Prism 5 was used to create the artwork.

3. Results

3.1. Cardiac function

3.1.1. Echocardiography

Overall, initial analysis of echocardiography showed that all rats submitted to MI (MI, MIE, MIH groups) demonstrated an equal impairment on cardiac function, presenting reduced EF and increased ESV, as compared to the SHAM group (Table 1). No changes were detected in the CO, HR, SPWT, and DPWT. The infarct size was approximately 50% in the infarcted groups (no significant differences among them), showing that the experimental model of MI was successfully reproduced. ESV was reduced in MIH as compared to the MIE group. The MIE group also showed the highest EDV.

The final analysis of echocardiography revealed an improvement in cardiac remodeling as well as function in MIH group, as there was a significant reduction (8%) in the infarct size in the MIH group compared to the MI group. In fact, the values of the final infarcted area increased by 2% in the MI and reduced more than 3% in both the MIE and MIH groups, as compared to their initial infarct size. The reduced EF due to MI showed a trend towards recovery at the final stage in the MIH group, which presented EFs of 33% and 28% superior to MI and MIE respectively.

All infarcted groups (MI, MIE, MIH) showed depressed heart function compared to SHAM, as there was a significant increase in both ESV and EDV. However, the MIH group presented a significant improvement in these parameters compared to MI. There was no difference between the MIE and MI groups. When initial to the final difference in ESV and EDV was considered, both MIE and MIH showed improvement compared to MI, but MIH showed a greater improvement than the MIE group. CO and HR showed no differences between groups.

The MI group showed reduced wall thickness (SPWT) compared to SHAM. The MIE and MIH groups were similar to both SHAM and MI groups. With respect to the difference between initial and final analysis,

MIH was significantly more efficient for recovering the systolic wall thickness, presenting a recovery of 0.08 cm in the wall thickness compared to 0.02 cm for MI. The MIE group did not differ from either the MI or MIH groups. In the final DPWT measurement, there was no difference between infarcted and SHAM rats. However, both the MIE and MIH groups showed an increase in diastolic wall thickness compared to MI.

3.1.2. Left ventricle catheterization

In the MI group, LVSP was impaired compared to SHAM. The MIE and MIH groups were not different from MI (Fig. 1A). There were no differences among groups with respect to LVEDP (Fig. 1B), maximum contractility (+dP/dt) (Fig. 1C), minimum contractility (–dP/dt) (Fig. 1D), and HR (Fig. 1E). On the other hand, +dP/dt-EDV ratio was depressed in all infarcted groups (MI, MIE, and MIH) as compared to SHAM (Fig. 1F).

3.2. T3, T4, and TSH hormones by ELISA assay

Total T3, T4, and TSH results (Fig. 2A–C) showed no differences among groups, indicating that both aerobic exercise training and T3 and T4 treatment, as well as the MI, did not influence the levels of thyroid hormones.

3.3. Morphometric analysis

Body weight did not differ between groups (Table 2). Heart weight was increased in MI and MIH rats as compared to SHAM, while the MIE group was similar to SHAM. The hypertrophy index of heart/body weight increased in MI, MIE and MIH as compared to SHAM. However, results of the heart to the tibia length index were increased only in MI and MIH compared to SHAM. No group had lung or liver congestion compared to SHAM, but the aerobic exercise training did reduce the lung W/D ratio as compared to MI.

3.4. Calcium transport and contractile status by western blotting

Our SERCA 1 data showed a reduced protein expression in the MIE group compared to the MI group (Fig. 3A). SERCA 2, which is mainly expressed in the heart, was reduced in all infarcted groups compared to SHAM (Fig. 3B). SERCA 3 was depressed in both the MIE and MIH groups compared to SHAM and MI (Fig. 3C). Representative bands of SERCA 1/2/3 are shown in Fig. 3D. p-PLB did not differ among groups (Fig. 4A). The PLB and PLB to SERCA 2 ratio were increased in the MIE and MIH groups compared to SHAM and MI (Fig. 4B and C). Representative bands of p-PLB and PLB are shown in Fig. 4D. RyR expression was similar among groups (Fig. 5A). MIE had an increase in MYH 1/2/4/6 expression compared to SHAM and MI (Fig. 5B). Representative bands of RyR and MYH1/2/4/6 are shown in Fig. 5C. PGC1- α and HIF1- α were not different between groups (Fig. 6A and 6B). MIE and MIH had a reduction in the expression of HSP70 compared to SHAM (Fig. 6C). Representative bands of PGC1- α , HIF1- α , and HSP70 are shown in Fig. 6D.

4. Discussion

The initial (2 days) echocardiography showed that the MI model was well reproduced, demonstrating impairment in EF and ESV, with no changes in the CO, HR, SPWT or DPWT, as well as an infarct size of nearly 50%. This study is the first to compare the effects of low dose T3 and T4 as a therapeutic alternative to that of the aerobic exercise training in post-MI rats. The main findings show that 10-week post-MI aerobic exercise training, as well as thyroid hormones treatment, provide improvement in many parameters of cardiac function (reduced infarct size, ESV and EDV; and increased EF and DPWT), cardiac hypertrophy (increased heart/body weight index), and a turn over to

Table 1

Results of initial and final echocardiographic analysis.

Parameter	SHAM	MI	MIE	MIH
Infarct size (%)				
Initial	0.00 ± 0.00	49.63 ± 12.85 ^a	51.37 ± 10.26 ^a	47.10 ± 8.74 ^a
Final	0.00 ± 0.00	52.00 ± 7.89 ^{a,d}	47.44 ± 4.94 ^a	43.58 ± 5.78 ^{a,b}
Difference	0.00 ± 0.00	2.37 ± 9.01	−3.96 ± 10.46	−3.64 ± 9.73
EF (%)				
Initial	71.92 ± 5.33	40.17 ± 7.43 ^a	39.97.0 ± 10.71 ^a	49.21 ± 6.88 ^a
Final	79.07 ± 2.32	40.40 ± 8.40 ^{a,d}	42.08 ± 3.52 ^{a,d}	53.76 ± 9.79 ^{a,b,c}
Difference	7.14 ± 7.10	0.23 ± 4.43	2.11 ± 11.03	4.55 ± 8.97
ESV (ml)				
Initial	0.06 ± 0.02	0.17 ± 0.04 ^a	0.19 ± 0.03 ^{a,d}	0.14 ± 0.03 ^{a,c}
Final	0.08 ± 0.01	0.54 ± 0.17 ^{a,d}	0.42 ± 0.08 ^a	0.29 ± 0.11 ^{a,b}
Difference	0.01 ± 0.02	0.37 ± 0.14 ^{a,c,d}	0.22 ± 0.07 ^{a,b}	0.15 ± 0.11 ^b
EDV (ml)				
Initial	0.22 ± 0.04	0.29 ± 0.07	0.33 ± 0.04 ^a	0.28 ± 0.03
Final	0.39 ± 0.04	0.89 ± 0.18 ^{a,d}	0.73 ± 0.12 ^a	0.62 ± 0.15 ^{a,b}
Difference	0.16 ± 0.05	0.60 ± 0.17 ^{a,c,d}	0.40 ± 0.11 ^{a,b}	0.33 ± 0.15 ^b
CO (ml/min)				
Initial	45.79 ± 8.94	42.47 ± 6.66	39.61 ± 6.73	41.03 ± 2.37
Final	70.71 ± 9.62	73.27 ± 12.08	68.83 ± 14.31	74.21 ± 19.42
Difference	30.49 ± 10.28	24.71 ± 12.07	26.30 ± 11.69	23.75 ± 12.63
HR (beats/min)				
Initial	276.20 ± 24.14	299.99 ± 43.67	298.97 ± 7.82	296.58 ± 27.97
Final	227.01 ± 24.52	208.95 ± 20.83	222.11 ± 28.25	226.94 ± 37.87
Difference	−48.62 ± 23.47	−105.42 ± 51.59	−76.64 ± 22.91	−86.71 ± 27.46
SPWT (cm)				
Initial	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.04	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.03
Final	0.28 ± 0.01	0.23 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.02	0.27 ± 0.03
Difference	0.05 ± 0.02	0.02 ± 0.04 ^d	0.03 ± 0.03	0.08 ± 0.03 ^b
DPWT (cm)				
Initial	0.11 ± 0.00	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.02
Final	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01 ^{c,d}	0.16 ± 0.01 ^b	0.16 ± 0.01 ^b
Difference	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.03

Initial (2 days after MI) and final (10 weeks after MI) results of Infarct size, ejection fraction (EF), end-systolic volume (ESV), end-diastolic volume (EDV), cardiac output (CO), heart rate (HR), systolic posterior wall thickness (SPWT), and diastolic posterior wall thickness (DPWT). Results are expressed as mean ± SD. n = 8/group. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones.

^a P < 0.05 as compared to SHAM.

^b P < 0.05 as compared to MI.

^c P < 0.05 as compared to MIE.

^d P < 0.05 as compared to MIH.

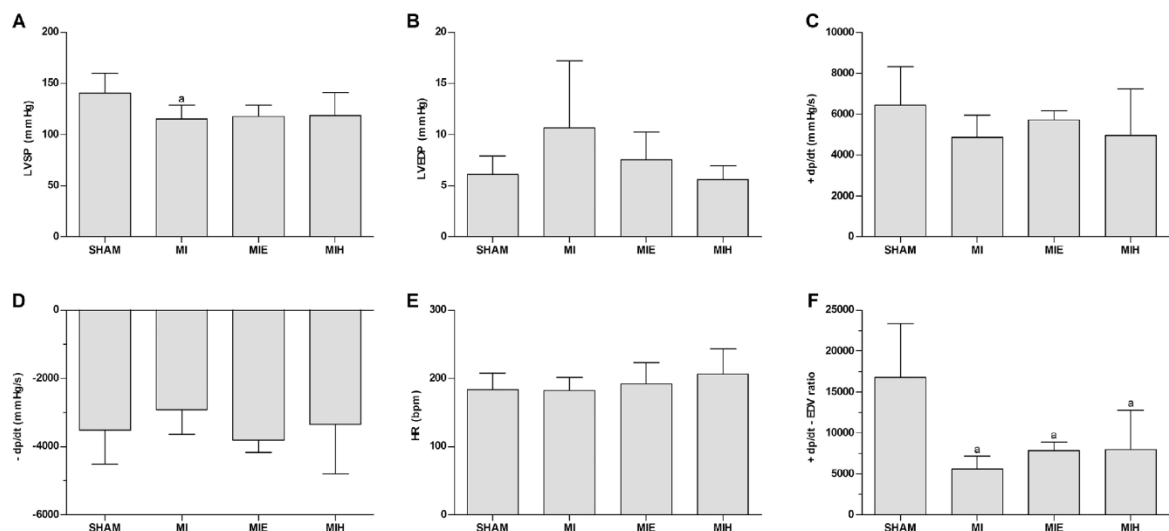


Fig. 1. Left ventricle (LV) function by catheterization at 74 days post-MI. A) LV systolic pressure (LVSP). B) LV end diastolic pressure (LVEDP). C) Maximum contractility (+ dp/dt). D) Minimum contractility (− dp/dt). E) Heart rate (HR). F) + dp/dt-end diastolic volume (EDV) ratio. Results are expressed as mean ± SD. N = 7 SHAM, 8 MI, 6 MIE, and 6 MIH. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones. ^a P < 0.05 as compared to SHAM.

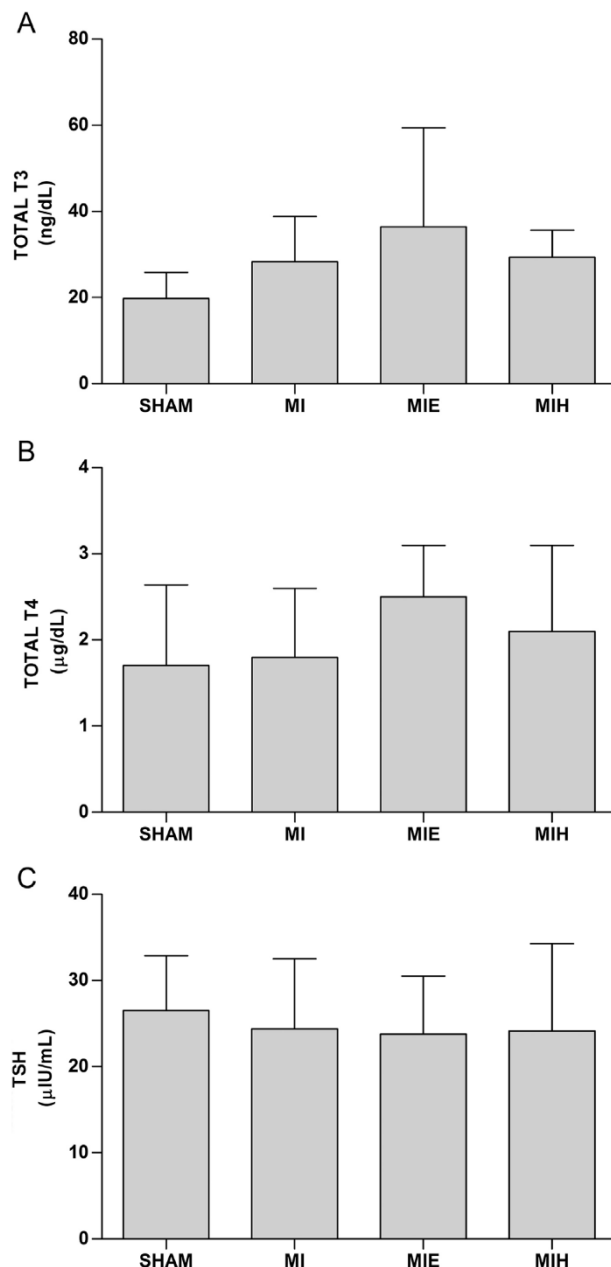


Fig. 2. Thyroid hormones levels at 74 days post-MI. A) Total triiodothyronine (T3). B) Total thyroxine (T4). C) Thyroid-stimulating hormone (TSH). Results are expressed as mean \pm SD. n = 4/group. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones.

positive force-frequency relationship (increased PLB/SERCA2 ratio). These effects were promoted without any alterations in the thyroid hormones levels (T3, T4, and TSH). For some parameters, such as EF, ESV, EDV, SPWT, and heart/tibia length index, the hormone treatment showed some additional benefits as compared to the aerobic exercise training.

The beneficial effects of exercise training and thyroid hormones in terms of EF have also been reported by others [20–22,24,38,45,46]. Although both the short-term or long-term hormone treatments at higher doses did not affect the infarct area [20,21,23,24], our data showed that lower doses of thyroid hormones for the long term was apparently able to reduce the infarct size.

There were no alterations between groups in either the aerobic exercise training or thyroid hormone treatments, with respect to CO and HR. It is known that elevated HR is a risk factor for heart failure, as it is associated with increased risk of rehospitalization and mortality [25–27]. In this regard, exercise training promotes a reduction on HR after MI [45,46]. Thyroid hormones treatment, however, was previously reported to increase the HR [20,21,23], and this could be due to its chronotropic effects. However, an increase in HR was not seen with the hormone treatments. It is likely that the dose of thyroid hormones administered in our study promotes beneficial effects without alterations in the HR.

The results of LV catheterization showed that the LVSP was reduced in the MI group as has also been reported by others [24]. Apparently, MIE and MIH were both unable to reverse the cardiac function damage induced by MI.

However, this result may reflect an intermediate beneficial effect of both interventions, since MIE and MIH did not have impairment in LVSP as compared to the SHAM group. Differing from our study, a previous study showed that thyroid hormones increase the LVSP, decrease the LVEDP, and increase the $+dP/dt$ and $-dP/dt$ post-MI [24], which might have been due to the difference in the doses of hormones that were used.

As showed by our $+dP/dt$ -EDV ratio results, the MI rats had their contractility reduced, in accordance with previous studies [1,24]. Both treatments partially blunted the decrease in the LVSP. In fact, this protecting effect in the LVSP, associated with reduced infarct area and increased EF indicates that both treatments offer protection in the cardiac remodeling.

A close relation exists between the levels of thyroid hormones and the cardiac function and contractility status [29,46,47]. Since the hypothyroidism, as well as hyperthyroidism, is related to heart failure and atrial fibrillation, the maintenance of thyroid hormones at physiological levels is of major importance for a normal cardiac function [28,29]. In this regard, previous studies using both short and long-term thyroid hormone treatments have demonstrated increased plasma levels of T3 and/or T4 hormones and/or decrease in TSH [20,21,24]. However, the low dose used in our study did not cause changes in the levels of T3, T4, or TSH. Therefore, the fact that both thyroid hormone treatments and exercise training promoted beneficial effects in the cardiac function, maintaining T3, T4 and TSH levels, and HR, revealed that the dose of thyroid hormones used in our study might promote beneficial effects without exceeding the physiological levels. Supporting these data, a previous study showed that a low dose of T3 as treatment provided similar benefits on cardiac function, thyroid hormones levels, and in HR in female Sprague-Dawley rats 2 months post-MI [48].

As shown by our morphometry results, the MI, MIE and MIH groups developed cardiac hypertrophy. This result was previously shown in both exercise training and thyroid hormones treatment studies post-MI [9,24]. However, we noticed that the hypertrophy seems to be more accentuated due to the thyroid hormones treatment than the exercise training.

Cardiac contractility can be enhanced by an increase in the frequency of stimulation [49], and the relation between the frequency of stimulation and the response in contractility is termed a force-frequency relationship [50]. A negative force-frequency relationship was reported in the human heart failure [51], and consists of a contractility diminished in response to an elevation in the frequency of stimulation. It was also demonstrated that the frequency-dependent alterations in force are related to changes in cytosolic calcium concentrations [52]. SERCA 2 protein acts in the transportation of calcium into the sarcoplasmic reticulum and is the predominant mediator of calcium effects on contractility. As their activity can be inhibited by PLB, the force-frequency relationship can be determined by the PLB to SERCA 2 ratio [53]. An increase in PLB and decrease in the expression of SERCA 2 in both MIE and MIH indicate that PLB is inhibiting SERCA 2. Therefore, our data suggest that aerobic exercise training, as well as thyroid

Table 2

Morphometric analysis and hypertrophy indices in the 74 days post-MI.

Measurement	SHAM	MI	MIE	MIH
Body weight (g)	450.14 ± 21.71	443.12 ± 31.40	421.22 ± 22.38	428.33 ± 27.43
Heart weight (g)	0.98 ± 0.07	1.19 ± 0.11 ^a	1.08 ± 0.09	1.20 ± 0.09 ^a
Heart/Body weight (mg/g)	2.18 ± 0.10	2.71 ± 0.36 ^a	2.56 ± 0.12 ^a	2.88 ± 0.21 ^a
Heart/Tibia length (mg/cm)	25.11 ± 1.60	30.53 ± 2.88 ^a	27.76 ± 2.39	31.25 ± 2.52 ^a
Lung W/D weight ratio	4.55 ± 0.14	4.79 ± 0.41	4.39 ± 0.18 ^b	4.49 ± 0.23
Liver W/D weight ratio	3.29 ± 0.05	3.42 ± 0.25	3.37 ± 0.16	3.37 ± 0.24

Results are expressed as mean ± SD. n = 8/group. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones. LV = left ventricle; RV = right ventricle.

^a P < 0.05 as compared to SHAM.

^b P < 0.05 as compared to MI.

hormone treatments, are increasing the availability of calcium in the myoplasm. The PLB to SERCA 2 ratio showed a positive force-frequency relationship by both interventions and indicated that the heart is more responsive. Previous short-term and long-term studies, which investigated the effects of higher doses of thyroid hormones post-MI, found not only increased SERCA expression, but also no changes on PLB, and increased SERCA/PLB ratio [20,21]. As the overexpression of SERCA 2 is related to a more negative force-frequency relationship [53], which occurs in the heart failure [51], we would like to suggest that lower doses of T3 and T4 can promote more benefits than higher doses of thyroid hormones.

Even though the improvement in the force-frequency relationship is usually accompanied by a reduction on contractility [53], this was not confirmed by the α -MHC protein expression. The gene expression level of α -MHC is a key factor determining cardiac contractility, and its expression, as well as the cardiac contractility, is depressed in heart failure [54]. However, our results of MYH 1/2/4/6 expression (isoforms of α -MHC) indicated an increase in the contractility promoted by the aerobic exercise training post-MI. Although not reaching statistical significance, the thyroid hormones treatment post-MI increased α -MHC

expression by 1.43-fold compared to MI, being more similar to SHAM than MIE. Therefore, partially different of the study of Meyer and collaborators [53], our result indicates that the improvement in the force-frequency relationship may have been accompanied by an increased contractility in this case, which can be correlated to the elevation on EF that was promoted by both aerobic exercise training and T3 and T4 treatments 10 weeks post-MI. Agreeing with our study, a previous study reported that aerobic exercise training increased the α -MHC expression 8 weeks after MI [12]. Regarding the thyroid hormones treatment, it was shown to promote both an increase and a decrease in α -MHC expression, 2 weeks after and 13 weeks after MI, respectively. In both cases, the alteration in α -MHC expression was accompanied either by an elevation in SERCA 2 or by an increase in SERCA 2 to PLB ratio [20,21].

In the context of cardiac remodeling after MI, high levels of HSP70 have been associated with pathological processes, systemic inflammation, the progression of heart failure and increased mortality [4,30,55]. Corroborating with those studies, we found an increase in HSP70 protein expression after MI and both aerobic exercise training and thyroid hormones treatments were effective in reducing the HSP70 expression.

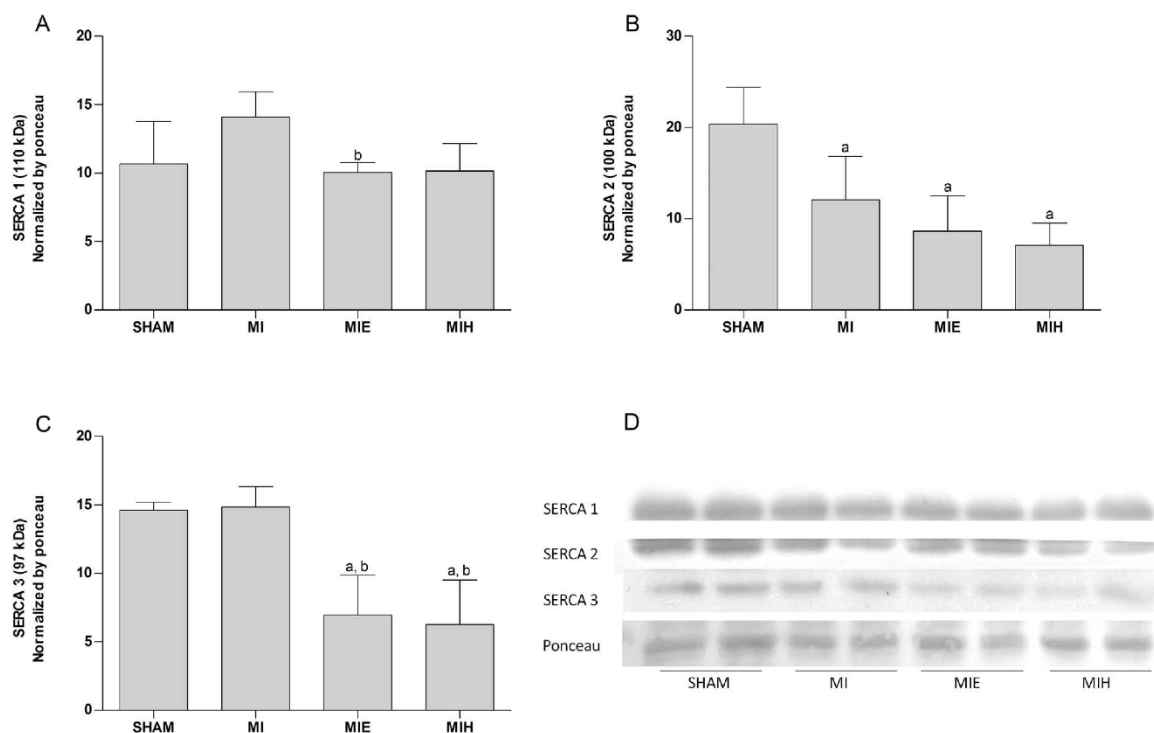


Fig. 3. Calcium transport to the sarcoendoplasmic reticulum (SER) at 74 days post-MI. A) SER calcium transport ATPase (SERCA) 1. B) SERCA 2. C) SERCA 3. D) Image bands of SERCA 1, 2, 3 and Ponceau. Results were normalized by Ponceau and are expressed as mean ± SD. n = 4/group. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones. ^a P < 0.05 as compared to SHAM. ^b P < 0.05 as compared to MI.

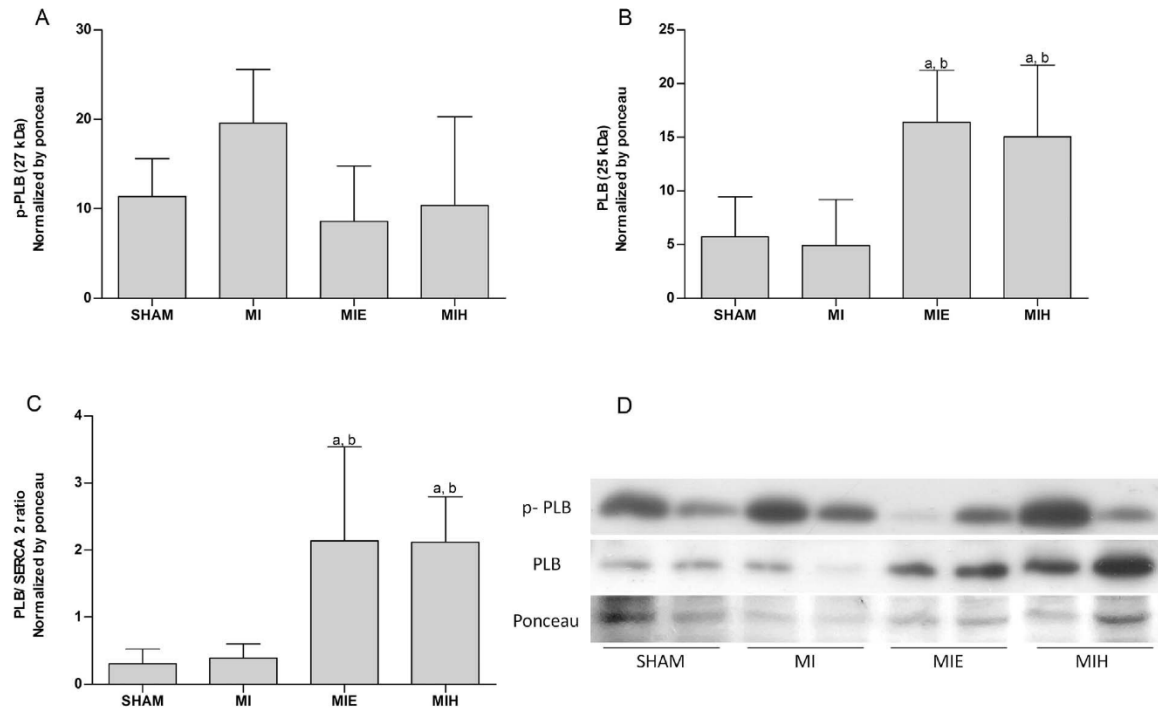


Fig. 4. Calcium transport modulation at 74 days post-MI. A) Phospho-phospholamban (p-PLB). B) Phospholamban (PLB). C) PLB/SERCA 2 ratio. D) Image bands of p-PLB, PLB, and Ponceau. Results were normalized by Ponceau and are expressed as mean \pm SD. $n = 4$ /group. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones. ^a $P < 0.05$ as compared to SHAM. ^b $P < 0.05$ as compared to MI.

This result could mean that aerobic exercise training, as well as thyroid hormones treatment, provide protection against the progression to heart failure. This aspect could be a key to prolonging the survival after MI. However, a previous study, with long-term thyroid hormones treatment (at a higher dose than in our study) found a marked increase in the HSP70 expression [20]. Therefore, beneficial results are dependent on dose administrated, indicating that high doses could be

detrimental in the cardiac remodeling process.

In conclusion, the results of this study revealed that lower doses of thyroid hormones for long-term could be a better alternative for patients where aerobic exercise training may not be well tolerated after MI.

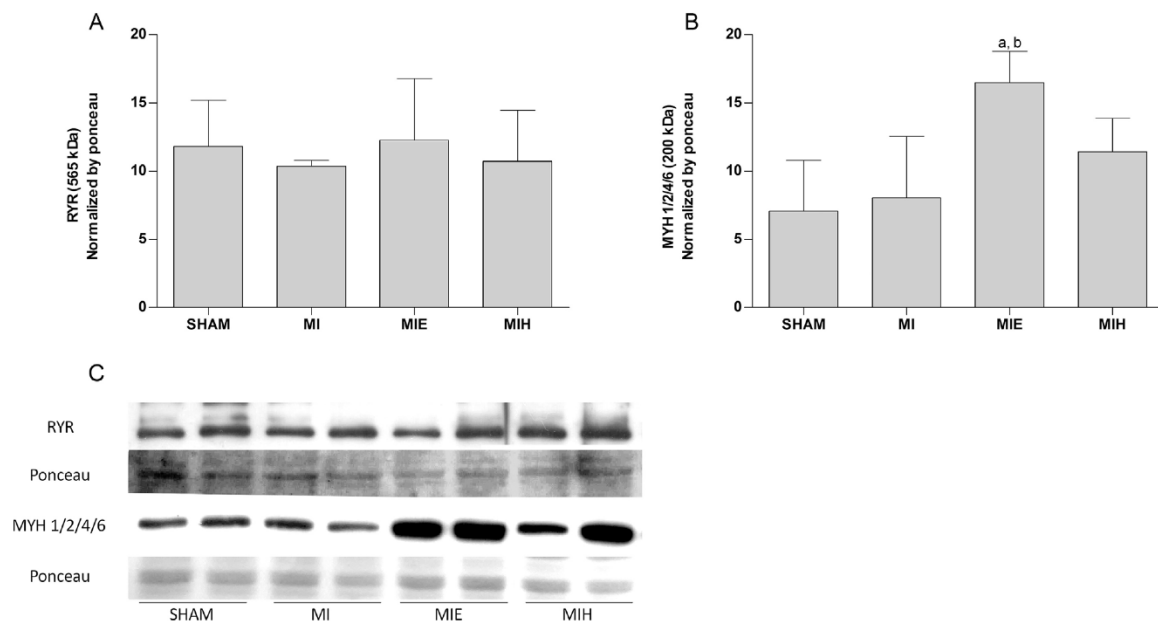


Fig. 5. Ryanodine receptor (RyR) and myosin heavy chain (MYH) analysis at 74 days post-MI. A) RyR. B) MYH. C) Image bands of RyR, MYH and Ponceau. Results were normalized by Ponceau and are expressed as mean \pm SD. $n = 4$ /group. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones. ^a $P < 0.05$ as compared to SHAM. ^b $P < 0.05$ as compared to MI.

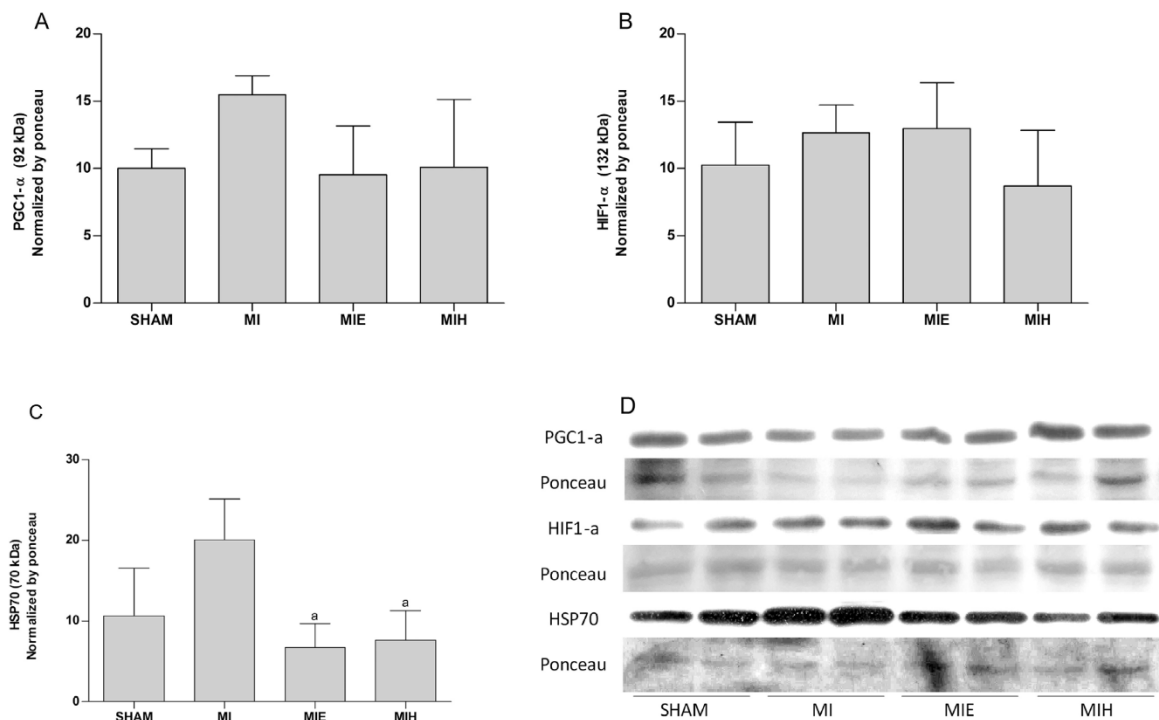


Fig. 6. Proteins involved in the cardiac remodeling at 74 days post-MI. A) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1-α). B) Hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1-α). C) Heat shock protein 70 (HSP70). D) Image bands of PGC1-α, HIF1-α, HSP70 and respective Ponceau. Results were normalized by Ponceau and are expressed as mean \pm SD. n = 4/group. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones. ^a P < 0.05 as compared to MI.

5. Study limitations

Although this study revealed promising results, some limitations should be considered in further studies. The first limitation is that we demonstrated effects of the thyroid hormones treatment as an isolated treatment, and further investigations about interactive effects with the current therapeutics for MI should be considered. This study focused only on the cardiac and thyroid function. However, other parameters, such as redox status and the effects on other tissues, remain to be clarified. Studies with heart failure models are needed to investigate whether thyroid hormone treatment is really effective at promoting exercise tolerance at this stage.

Funding

This work was supported by the National Council of Technological and Scientific Development (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Conflicts of interest

None.

Acknowledgments

Veterinary medical support from Dr. André Ricardo Ribeiro Belló. Technician support from Tânia Regina Gatelli Fernandes-Piedras. This data was written during a scholarship supported by the International Cooperation Program CAPES/DFATD at the University of Manitoba. Dr. Singal is the recipient of the Naranjan Dhalla chair of the St. Boniface Hospital Foundation, Winnipeg, Canada.

References

- [1] W.J. Richardson, S.A. Clarke, T.A. Quinn, J.W. Holmes, Physiological implications of myocardial scar structure, *Compr. Physiol.* 5 (4) (2016) 1877–1909, <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c140067>.
- [2] M.A. Garza, E.A. Wason, J.Q. Zhang, Cardiac remodeling and physical training post myocardial infarction, *World J. Cardiol.* 7 (2) (2015) 52–64, <http://dx.doi.org/10.4330/wjc.v7.i2.52>.
- [3] M. Gheorghiade, R.O. Bonow, Chronic heart failure in the United States. A manifestation of coronary artery disease, *Circulation* 97 (1998) 282–289, <http://dx.doi.org/10.1161/01.CIR.97.3.282>.
- [4] Z.M. Jenei, T. Gombos, Z. Föhrécz, Z. Pozsonyi, I. Karádi, L. Jánoskúti, Z. Prohászka, Elevated extracellular HSP70 (HSPA1A) level as an independent prognostic marker of mortality in patients with heart failure, *Cell Stress Chaperones* 18 (6) (2013) 809–813, <http://dx.doi.org/10.1007/s12192-013-0425-z>.
- [5] M. Haykowsky, J. Scott, B. Esch, D. Schopflocher, J. Myers, I. Paterson, D. Warburton, L. Jones, A.M. Clark, A meta-analysis of the effects of exercise training on left ventricular remodeling following myocardial infarction: start early and go longer for greatest exercise benefits on remodeling, *Trials* 4 (2011) 12–92, <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6215-12-92>.
- [6] M. Kargarfard, R. Rouzbehani, F. Basati, Effects of exercise rehabilitation on blood pressure of patients after myocardial infarction, *Int. J. Prev. Med.* 1 (2) (2010) 124–130 PMID: PMC3075474.
- [7] T.C. Peixoto, I. Begot, D.W. Bolzan, L. Machado, M.S. Reis, V. Papa, A.C. Carvalho, R. Arena, W.J. Gomes, S. Guizilini, Early exercise-based rehabilitation improves health-related quality of life and functional capacity after acute myocardial infarction: a randomized controlled trial, *Can. J. Cardiol.* 31 (3) (2015) 308–313, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cjca.2014.11.014>.
- [8] R.A. Gary, M.E. Cress, M.K. Higgins, A.L. Smith, S.B. Dunbar, A combined aerobic and resistance exercise program improves physical functional performance in patients with heart failure: a pilot study, *J. Cardiovasc. Nurs.* 27 (5) (2012) 418–430, <http://dx.doi.org/10.1097/JCN.0b013e31822ad3c3>.
- [9] X. Xu, W. Wan, L. Ji, S. Lao, A.S. Powers, W. Zhao, J.M. Erikson, J.Q. Zhang, Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodelling in rats, *Cardiovasc. Res.* 78 (2008) 523–532, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvn028>.
- [10] X. Xu, W. Zhao, W. Wan, L.L. Ji, A.S. Powers, J.M. Erikson, J.Q. Zhang, Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade reduces oxidative stress after myocardial infarction in rats, *Exp. Physiol.* 95 (10) (2010) 1008–1015, <http://dx.doi.org/10.1113/expphysiol.2010.054221>.
- [11] L. Daniłowicz-Szymanowicz, M. Figura-Chmielewska, W. Ratkowski, G. Raczak, Effect of various forms of physical training on the autonomic nervous system activity in patients with acute myocardial infarction, *Kardiol. Pol.* 71 (6) (2013)

- 558–565, <http://dx.doi.org/10.5603/KP.2013.0118>.
- [12] W. Wan, X. Xu, W. Zhao, M.A. Garza, J.Q. Zhang, Exercise training induced myosin heavy chain isoform alteration in the infarcted heart, *Appl. Physiol. Nutr. Metab.* 39 (2) (2014) 226–232, <http://dx.doi.org/10.1139/apnm-2013-0268>.
 - [13] C.A. Pinho, C.B. Tromm, A.M. Tavares, L.A. Silva, P.C. Silveira, C.T. Souza, M. Benetti, R.A. Pinho, Effects of different physical training protocols on ventricular oxidative stress parameters in infarction-induced rats, *Life Sci.* 90 (13–14) (2012) 553–559, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2012.01.018>.
 - [14] A.M. Zanella, D.R.S. Souza, M.F. Godoy, Influence of the physical exercise on the lipid profile and oxidative stress, *Arq. Ciênc. Saúde* 14 (2) (2007) 107–112.
 - [15] A.C. Hackney, A. Kallman, K.P. Hosick, D.A. Rubin, C.L. Battaglini, Thyroid hormonal responses to intensive interval versus steady-state endurance exercise sessions, *Hormones* 11 (1) (2012) 54–60 PMID: 22450344.
 - [16] F. Ciloglu, I. Peker, A. Pehlivan, K. Karacabey, N. İlhan, O. Saygin, R. Ozmerdivenli, Exercise intensity and its effects on thyroid hormones, *Neuroendocrinol. Lett.* 26 (6) (2005) 830–834 PMID: 16380698.
 - [17] S. Adamopoulos, A. Gouzouta, P. Mantzouratou, I.D. Laoutaris, A. Dritsas, D.V. Cokkinos, I. Mourouzis, P. Sfyrikis, G. Iervasi, C. Pantos, Thyroid hormone signalling is altered in response to physical training in patients with end-stage heart failure and mechanical assist devices: potential physiological consequences? *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* 17 (2013) 664–668, <http://dx.doi.org/10.1093/icvts/ivt294>.
 - [18] R.G. Miller, M.D. Boska, R.S. Moussavi, P.J. Carson, M.W. Weiner, ³¹P nuclear magnetic resonance studies of high energy phosphates and pH in human muscle fatigue. Comparison of aerobic and anaerobic exercise, *J. Clin. Invest.* 81 (1988) 1190–1196, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI113434>.
 - [19] A. Pakarinen, K. Häkkinen, M. Alen, Serum thyroid hormones, thyrotropin and thyroxine binding globulin in elite athletes during very intense strength training of one week, *J. Sports Med. Phys. Fitness* 31 (1991) 142–146 PMID: 753718.
 - [20] C. Pantos, I. Mourouzis, K. Markakis, N. Tsagoulis, M. Panagiotou, D.V. Cokkinos, Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats, *Basic Res. Cardiol.* 103 (2008) 308–318, <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-008-0697-0>.
 - [21] C. Kalofoutis, I. Mourouzis, G. Galanopoulos, A. Dimopoulos, P. Perimenis, D. Spanou, D.V. Cokkinos, J. Singh, C. Pantos, Thyroid hormone can favorably remodel the diabetic myocardium after acute myocardial infarction, *Mol. Cell. Biochem.* 345 (2010) 161–169, <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0569-4>.
 - [22] I. Mourouzis, I. Giagourta, G. Galanopoulos, P. Mantzouratou, E. Kostakou, A.D. Kokkinos, N. Tentolouris, C. Pantos, Thyroid hormone improves the mechanical performance of the post-infarcted diabetic myocardium: a response associated with up-regulation of Akt/mTOR and AMPK activation, *Metabol. Clin. Exp.* 62 (2013) 1387–1393, <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2013.05.008>.
 - [23] A.L. de Castro, A.V. Tavares, C. Campos, R.O. Fernandes, R. Siqueira, A. Conzatti, A.M. Bicca, T.R. Fernandes, C.L. Sartório, P.C. Schenkel, A. Belló-Klein, A.S. da Rosa Araújo, Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction, *Mol. Cell. Endocrinol.* 391 (2014) 22–29, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.04.010>.
 - [24] A.L. de Castro, R.O. Fernandes, V.D. Ortiz, C. Campos, J.H. Bonetto, T.R. Fernandes, A. Conzatti, R. Siqueira, A.V. Tavares, P.C. Schenkel, A. Belló-Klein, A.S. da Rosa Araújo, Thyroid hormones improve cardiac function and decrease expression of pro-apoptotic proteins in the heart of rats 14 days after infarction, *Apoptosis* 21 (2) (2016) 184–194, <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-015-1204-3>.
 - [25] M. Böhm, J.C. Reil, Heart rate: surrogate or target in the management of heart failure? *Heart* 99 (2013) 72–75, <http://dx.doi.org/10.1136/heartjnl-2012-302301>.
 - [26] M. Böhm, K. Swedberg, M. Komajda, J.S. Borer, I. Ford, A. Dubost-Brama, G. Lerebours, L. Tavazzi, SHIFT Investigators, Heart rate as a risk factor in chronic heart failure (SHIFT): the association between heart rate and outcomes in a randomised placebo-controlled trial, *Lancet* 376 (9744) (2010) 886–894, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61259-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61259-7).
 - [27] W.K. Laskey, I. Alomari, M. Cox, P.J. Schulte, X. Zhao, A.F. Hernandez, P.A. Heidenreich, Z.J. Eapen, C. Yancy, D.L. Bhatt, G.C. Fonarow, AHA Get With The Guidelines®-Heart Failure Program, Heart rate at hospital discharge in patients with heart failure is associated with mortality and rehospitalization, *J. Am. Heart Assoc.* 4 (4) (2015), <http://dx.doi.org/10.1161/JAHA.114.001626> pii: e001626.
 - [28] Y. Zhang, E.I. Dedkov, D. Teplitzky, N.Y. Weltman, C.J. Pol, V. Rajagopalan, B. Lee, A.M. Gerdes, Both hypothyroidism and hyperthyroidism increase atrial fibrillation inducibility in rats, *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 6 (5) (2013) 952–959, <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCEP.113.000502>.
 - [29] H. Vargas-Uricoechea, C.H. Sierra-Torres, Thyroid hormones and the heart, *Horm. Mol. Biol. Clin. Invest.* 18 (1) (2014) 15–26, <http://dx.doi.org/10.1515/hmbci-2013-0059>.
 - [30] M. Satoh, Y. Shimoda, T. Akatsu, Y. Ishikawa, Y. Minami, M. Nakamura, Elevated circulating levels of heat shock protein 70 are related to systemic inflammatory reaction through monocyte Toll signal in patients with heart failure after acute myocardial infarction, *Eur. J. Heart Fail.* 8 (8) (2006) 810–815, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejheart.2006.03.004>.
 - [31] T.N.P. Johns, B.J. Olson, Experimental myocardial infarction: a method of coronary occlusion in small animals, *Ann. Surg.* 140 (1954) 675–682 PMID: PMC1609650.
 - [32] M.L. Batista Jr., R.V.T. Santos, E.M. Oliveira, M.C.L. Seelaender, L.F.B.P. Costa Rosa, Endurance training restores peritoneal macrophage function in post-MI congestive heart failure rats, *J. Appl. Physiol.* 102 (5) (2007) 2033–2039, <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00871.2006>.
 - [33] Y. Wang, S. Wang, W.G. Wier, Q. Zhang, H. Jiang, Q. Li, S. Chen, Z. Tian, Y. Li, X. Yu, M. Zhao, J. Liu, J. Yang, J. Zhang, W. Zang, Exercise improves the dilatation function of mesenteric arteries in postmyocardial infarction rats via a PI3 K/Akt/eNOS pathway-mediated mechanism, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299 (6) (2010) H2097–106, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00701.2010>.
 - [34] B. Rodrigues, D.M. Figueroa, C.T. Mostarda, M.V. Heeren, M.C. Irigoyen, K. De Angelis, Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats, *Cardiovasc. Diabetol.* 6 (2007) 38, <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2840-6-38>.
 - [35] E. Nozawa, R.M. Kanashiro, N. Murad, A.C. Carvalho, S.L. Cravo, O. Campos, P.J. Tucci, V.A. Moises, Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39 (5) (2006) 687–695 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2006000500016>.
 - [36] A.M. Tavares, A.S. da Rosa Araújo, G. Baldo, U. Matte, N. Khaper, A. Belló-Klein, L.E. Rohde, N. Clausell, Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction, *Life Sci.* 87 (23–26) (2010) 699–706, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.008>.
 - [37] A.P. Peron, R.M. Saraiva, E.L. Antonio, P.J. Tucci, Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction despite congestive heart failure, *Arq. Bras. Cardiol.* 86 (2) (2006) 105–112 <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2006000200005>.
 - [38] S.A.d. Almeida, E.R.G. Claudio, V.F. Mengal, S.G.d. Oliveira, E. Merlo, P.L. Podratz, S.A. Gouveia, J.B. Graceli, G.R. de Abreu, Exercise training reduces cardiac dysfunction and remodeling in ovariectomized rats submitted to myocardial infarction, *PLoS One* 9 (12) (2014) e115970, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115970>.
 - [39] P. Pachter, J.G. Mabley, L. Liaudet, O.V. Evgenov, A. Marton, G. Haskó, M. Kollai, C. Szabó, Left ventricular pressure-volume relationship in a rat model of advanced aging-associated heart failure, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287 (5) (2004) H2132–H2137, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00405.2004>.
 - [40] F.C. Yin, H.A. Spurgeon, K. Rakusan, M.L. Weisfeldt, E.G. Lakatta, Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat, *Am. J. Physiol.* 243 (6) (1982) H941–H947 PMID: 6216817.
 - [41] L.W. Hu, L.A. Benvenuti, E.A. Liberti, M.S. Carneiro-Ramos, M.L.M. Barreto-Chaves, Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 285 (6) (2003) R1473–1480, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00269.2003>.
 - [42] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (5259) (1970) 680–685, <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.
 - [43] O.H. Lowry, A.L. Rosebrough, A.L. Farr, R. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1) (1951) 265–275 PMID: 14907713.
 - [44] D. Klein, R.M. Kern, R.Z. Sokol, A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36 (1) (1995) 59–66 PMID: 7545052.
 - [45] N.L. Izeli, A.J. Santos, J.C. Crescêncio, A.C. Gonçalves, V. Papa, F. Marques, A. Pazin-Filho, L. Gallo-Júnior, A. Schmidt, Gonadal training after myocardial infarction: remodeling evaluated by cardiac magnetic resonance, *Arq. Bras. Cardiol.* 106 (4) (2016) 311–318, <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20160031>.
 - [46] D.J. Feriani, G.I. Souza, N.M. Carrozzi, C. Mostarda, M. Mourado, F.M. Consolim-Colombo, K. De Angelis, H. Moreno, M.C. Irigoyen, B. Rodrigues, Impact of exercise training associated to pyridostigmine treatment on autonomic function and inflammatory profile after myocardial infarction in rats, *Int. J. Cardiol.* 227 (2017) 757–765, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2016.10.061>.
 - [47] G.L. Roef, Y.E. Taes, J.M. Kaufman, C.M. Van Daele, M.L. De Buyzere, T.C. Gillebert, E.R. Rietzschel, Thyroid hormone levels within reference range are associated with heart rate, cardiac structure, and function in middle-aged men and women, *Thyroid* 8 (2013) 947–954, <http://dx.doi.org/10.1089/thy.2012.0471>.
 - [48] V. Rajagopalan, Y. Zhang, K. Ojamaa, Y.F. Chen, A. Pingitore, C.J. Pol, D. Saunders, K. Balasubramanian, R.A. Towner, A.M. Gerdes, Safe oral triiodo-L-thyronine therapy protects from post-infarct cardiac dysfunction and arrhythmias without cardiovascular adverse effects, *PLoS One* 11 (2016) e0151413.
 - [49] H.P. Bowditch, Über die Eigentümlichkeiten der reizbarkeit, welche die muskelfasern des herzens zeigen, *Ber. Sachs. Ges. Wiss.* 23 (1871) 652–689.
 - [50] B. Lewartowski, B. Pytkowski, Cellular mechanism of the relationship between myocardial force and frequency of contractions, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 50 (2) (1987) 97–120, [http://dx.doi.org/10.1016/0079-6107\(87\)90005-8](http://dx.doi.org/10.1016/0079-6107(87)90005-8).
 - [51] L.A. Mulieri, G. Hasenfuss, B. Leavitt, P.D. Allen, N.R. Alpert, Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure, *Circulation* 85 (5) (1992) 1743–1750 PMID: 1572031.
 - [52] S. Kurihara, D.G. Allen, Intracellular Ca⁺⁺ transients and relaxation in mammalian cardiac muscle, *Jpn. Circ. J.* 46 (1) (1982) 39–43 PMID: 6275138.
 - [53] M. Meyer, W.F. Bluhm, H. He, S.R. Post, F.J. Giordano, W.Y. Lew, W.H. Dillmann, Phospholamban-to-SERCA2 ratio controls the force-frequency relationship, *Am. J. Physiol.* 276 (3 Pt. 2) (1999) H779–H785 PMID: 10070059.
 - [54] L. Wei, L. Wang, X. Ouyang, H. Ying, S. Liu, Y. Qu, B. Liu, Z. Wang, Relationship between the expression level of alpha-MHC gene and cardiac contractility during heart failure, *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* 29 (1) (1998) 7–10 PMID: 10683970.
 - [55] L.P. Zuo, Y.B. Liang, H. Tang, H. Zhan, Z.B. Chen, Z.Y. Li, Z.F. Ma, The significance of the changes in expressions of heat shock protein 70 and heme oxygenase-1 in the myocardium in patients died suddenly due to acute myocardial infarction, *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 22 (2) (2010) 93–96 PMID: 20170613.

6.2 Artigo 2

Título: Exercise training *versus* T3 and T4 hormones treatment: the differential benefits of thyroid hormones on the parasympathetic drive of infarcted rats

Revista: Life Sciences

Data de publicação: Janeiro de 2018



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Exercise training versus T3 and T4 hormones treatment: The differential benefits of thyroid hormones on the parasympathetic drive of infarcted rats

Rayane Brinck Teixeira^a, Alexsandra Zimmer^a, Alexandre Luz de Castro^a,
Cristina Campos Carraro^a, Karina Rabello Casali^b, Ingrid Gonçalves Machuca Dias^b,
Alessandra Eifler Guerra Godoy^c, Isnard Elman Litvin^c, Adriane Belló-Klein^a,
Alex Sander da Rosa Araujo^{a,*}

^a Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Institute of Science and Technology (ICT), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

^c Research Institute for Multicenter Studies (IPCEM), University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Acute myocardial infarction
Exercise training
Thyroid hormones
Parasympathetic drive
Left ventricle function
Oxidative stress

ABSTRACT

Aims: This study aimed to investigate whether beneficial effects of thyroid hormones are comparable to those provided by the aerobic exercise training, to verify its applicability as a therapeutic alternative to reverse the pathological cardiac remodeling post-infarction.

Materials and methods: Male rats were divided into SHAM-operated (SHAM), myocardial infarction (MI), MI subjected to exercise training (MIE), and MI who received T3 and T4 treatment (MIH) ($n = 8/\text{group}$). MI, MIE and MIH groups underwent an infarction surgery while SHAM was SHAM-operated. One-week post-surgery, MIE and MIH groups started the exercise training protocol (moderate intensity on treadmill), or the T3 (1.2 $\mu\text{g}/100 \text{ g/day}$) and T4 (4.8 $\mu\text{g}/100 \text{ g/day}$) hormones treatment by gavage, respectively, meanwhile SHAM and MI had no intervention for 9 weeks. The groups were accompanied until 74 days after surgery, when all animals were anesthetized, left ventricle echocardiography and femoral catheterization were performed, followed by euthanasia and left ventricle collection for morphological, oxidative stress, and intracellular kinases expression analysis.

Key findings: Thyroid hormones treatment was more effective in cardiac dilation and infarction area reduction, while exercise training provided more protection against fibrosis. Thyroid hormones treatment increased the lipoperoxidation and decreased GSHPx activity as compared to MI group, increased the t-Akt2 expression as compared to SHAM group, and increased the vascular parasympathetic drive.

Significance: Thyroid hormones treatment provided differential benefits on the LV function and autonomic modulation as compared to the exercise training. Nevertheless, the redox imbalance induced by thyroid hormones highlights the importance of more studies targeting the ideal duration of this treatment.

1. Introduction

The indices of morbidity and mortality directly caused by acute myocardial infarction (MI) are still rising. One of the major concerns is the maladaptive remodeling following MI, which declines the cardiac function, and at long term, can lead to heart failure and reduction of lifespan [1,2]. The aerobic exercise training is an efficacious coadjutant method to improve the cardiac function and autonomic balance after MI [3]. However, in cases of exercise intolerance, other therapeutic approaches are necessary.

In this sense, many studies have shown that thyroid hormones treatment has diverse beneficial effects on the recovery of cardiac function after MI, since thyroid hormones may modulate intracellular pathways involved in cell survival [4–7]. Nevertheless, such benefits may be accompanied by adverse effects, including the modulation of autonomic system, through the increase in sympathetic drive and the heart rate, which in turn may impair the heart function and cause vascular dysfunction [8]. In addition, these function alterations may augment the oxygen consumption, provoking disruption of redox homeostasis by the elevation in mitochondrial activity and reactive

* Corresponding author at: Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, sala 344, CEP 90050170 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: alex.rosa@ufrgs.br (A.S. da Rosa Araujo).

<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.01.018>

Received 29 September 2017; Received in revised form 11 January 2018; Accepted 17 January 2018
0024-3205/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

oxygen species (ROS) formation [9].

In this context, many efforts have been made in order to find a safe and effective dose of thyroid hormones which is capable of improve the cardiac function with minimal adverse effects [10,11]. A low dose of only T3 was recently showed to be safe in female rats, post-infarction [10]. Moreover, we have recently reported a low dose combination of T3 and T4 hormones that presented similar results in male rats as well [12] and it could possibly be used as the alternative to the aerobic exercise training.

Therefore, the present study aimed to investigate whether T3 plus T4 hormone treatment (in lower doses than those reported in literature) provide benefits comparable, or even superior, to the ones stimulated by the aerobic exercise training. In this context, the major focus in this study was to analyze the sympathetic and parasympathetic drive, cardiac function, oxidative stress parameters, and intracellular kinases expression in order to guarantee a safe use of this hormonal therapy.

2. Materials and methods

2.1. Ethical statement

The present study was approved by the Ethics Committee on the use of animals of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul under the protocol number 29521, and all their ethical principles as well as the ARRIVE guidelines and the National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) were respected and followed during this study.

2.2. Experimental protocol

The Fig. 1 illustrates the experimental design of this study. A total of 40 male Wistar rats (190 ± 10 g) were provided by the Center for Reproduction and Experimentation of Laboratory Animals at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul. They were maintained under standard laboratory conditions (controlled temperature of 21 °C, 12 h light/dark cycle, water and pelleted food ad libitum), and allocated in plastic cages (four per cage). 8 rats were subjected to SHAM surgery (SHAM group). The other 32 animals were subjected to MI induction surgery by suturing the left anterior descending coronary artery [13], in which 4 rats died. All rats were anesthetized before the surgery (Ketamine 90 mg/kg and xylazine 10 mg/kg, intraperitoneally). Post-surgery analgesia included Tramadol (12.5 mg/kg, subcutaneously) and dipyrone (200 mg/kg, orally) twice a day for 2 days. After 48 h, the infarct size was measured by echocardiographic assessment, and 4 rats which had a small infarct area were excluded of the study. The remaining 24 rats were randomly divided into MI (myocardial infarction),

MIE (myocardial infarction plus exercise training) and MIH (myocardial infarction plus thyroid hormones) groups ($n = 8$ /group). Passed one week from surgery, animals into MIE group started the aerobic exercise training whereas MIH rats started to receive thyroid hormones. Both interventions were always performed at early-morning.

The aerobic exercise training protocol was executed on a treadmill (Imbramed KT-01) adapted for rats, with frequency of five times a week during 9 weeks, likewise in previous studies [14–16]. One week after the MI surgery, MIE group started an adaptation period by walking for 15 min on the treadmill with constant velocity (0.3 km/h), for four consecutive days. After the adaptation period, MIE group underwent a maximum speed test and started the training program. Duration and intensity of the exercise were gradually increased until reach 60 min of duration, and an intensity of 60% of the maximal oxygen consumption (VO_2 max) obtained in the maximum speed test [14,17]. The maximum speed test was repeated at the fourth week of protocol to adjust the workload.

The treatment with thyroid hormones consisted of T3 (1.2 µg/100 g/day) and T4 (4.8 µg/100 g/day) hormones (both from SIGMA-ALDRICH, USA), dissolved in NaOH 1 N and diluted in saline, with final pH adjustment to 7.0. The solution was prepared once a week and stored protected from light. Thyroid hormone treatment was administered to MIH group as follows: in a room without direct light, one time a day, from Monday to Friday, for 9 weeks, via intragastric gavage, beginning one week after MI surgery; total dose overtime was of 54 µg T3/100 g of animal, and 216 µg T4/100 g of animal. Whereas SHAM, MI, and MIE groups received only vehicle (the same volume of NaOH 1 N diluted in saline and final pH adjusted to 7.0).

After 10 weeks of MI surgery, all animals were weighed, anesthetized, cardiac function parameters were evaluated by echocardiography. Autonomic modulation and baroreflex sensitivity were accessed by femoral artery catheterization, followed by euthanasia through anesthetic overload (ketamine 90 mg/kg and xylazine 10 mg/kg, intraperitoneally) and confirmation of death by cervical dislocation. Left ventricle (LV) and tibia were collected, and used to morphometric analysis. After morphometric measurements, the scar of each LV was removed and the remaining LV tissue was separated in two parts. The first part was processed for histological analysis. The other part was immediately immersed in liquid nitrogen, stored at -80 °C, homogenized and used for oxidative stress and western blotting analyses.

2.3. Echocardiography

Transthoracic echocardiography was performed at 48 h (2 days, initial analysis) and 74 days (10 weeks, final analysis) after surgery. The animals were anesthetized by an intraperitoneal injection of ketamine

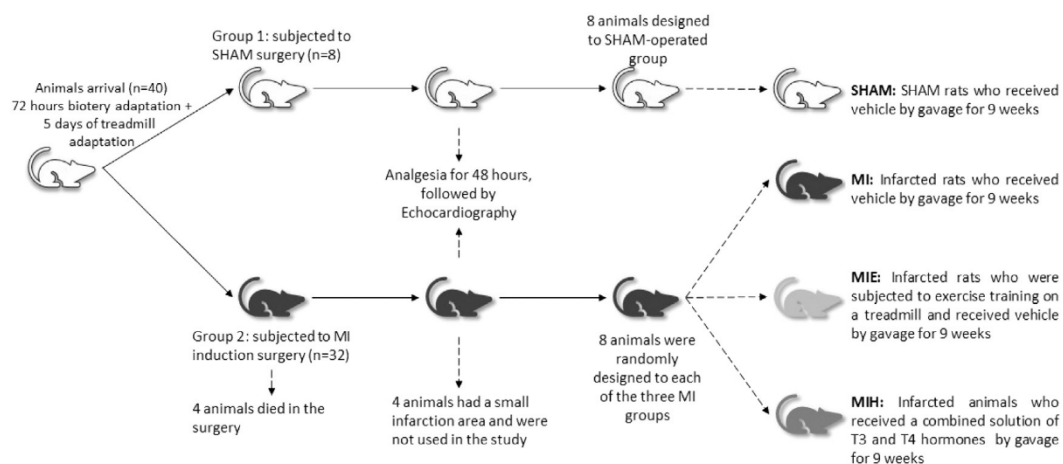


Fig. 1. Experimental design illustration.

90 mg/kg and xylazine 10 mg/kg and placed in left lateral decubitus position (45°). The images of the LV were obtained using Philips HD7 XE ultrasound system with a L12–13 MHz transducer, in 2D and M-mode. All parameters were analyzed at three levels: basal, middle, and apical, and the average of all three levels was taken as the final value [18,19].

Total perimeter, infarcted perimeter, systolic diameter (LVESD) (cm), diastolic diameter (LVEDD) (cm), fractional area change (FAC) (%), and fractional shortening (FS) (%) were obtained as in previous studies [18–20].

2.4. Femoral artery catheterization

Immediately after echocardiography, the right femoral artery was catheterized using a tygon tube (PE10, Clay Adams, USA) heparinized (1% Liqueimine 5000UI) and filled with saline. The pressure was monitored in a sound attenuated room for 2 min using a pressure transducer (Strain-Gauge Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155; Houston, Texas) connected to a pressure amplifier (HP 8805C, Hewlett Packard). Data were recorded by WinDaq Data Acquisition software (sampling frequency 2 kHz, Dataq Instruments, Inc., Akron, Ohio, USA).

Stationary sequences of 300 beats were randomly used to detect the systolic arterial pressure (SAP, mmHg), diastolic arterial pressure (DAP, mmHg), medium arterial pressure (MAP, mmHg), and heart rate (HR) for each animal. Autonomic modulation and baroreflex sensitivity were evaluated by spectral analysis considering two spectral components: low frequency (LF, 0.20 to 0.75 Hz) and high frequency (HF, 0.75 to 4.00 Hz), which were expressed in normalized units (n.u.), as LF [n.u.] and HF [n.u.], corresponding to sympathetic and parasympathetic drive, respectively [21–23]. The autonomic modulation of the systolic arterial pressure variability (SAPV) was evaluated by the following parameters: central frequency of the LF component of the SAPV (SAPV-LF, Hz), central frequency of the HF component of SAPV (SAPV-HF, Hz), LF component of SAPV (LF-SAPV, mmHg²), HF component of SAPV (HF-SAPV, mmHg²) [21,23]. The baroreflex sensitivity was measured by the Alpha LF index (ms/mmHg) [24–26].

2.5. Hypertrophy measurement

LV weight (in grams), and two hypertrophy indices were used to verify if there was cardiac hypertrophy. In the first index, the ratio between the LV weight (in milligrams), and the body weight (in grams) was considered [27]. In the second index, the hypertrophy was calculated as the LV weight (in milligrams), divided by the tibial length (in mm) [28].

2.6. Histological analysis

The LV (without scar) was cut in a transversal section at medial plane (approximately 64 mm², and 2 mm of thickness), fixed in 4% buffered formalin solution, and paraffinized. After paraffin blocking, each tissue was sliced in a microtome, obtaining 3 µm thick sections, which were stained using Masson's trichrome method [46–48].

All slides were individually analyzed by two pathologists, using an optic microscope (Leica DME, Leica Microsystems Inc., New York, USA). Each slide was classified according to the fibrosis severity in grade 0 (absent), grade 1 (low), grade 2 (moderate), and grade 3 (accentuated). The average result of both pathologists was considered for statistical analysis. Representative image of each group was obtained by a microscope-accoupled camera (EC 3 Leica Microsystems Inc., New York, USA).

2.7. Oxidative stress analysis

50 mg of each LV were weighed and homogenized (for 40 s) with

potassium chloride (KCl) 1,15% and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1 mM, using a Polytron homogenizer. The homogenized tissues were centrifuged for 15 min at 20000 rpm, in a refrigerated centrifuge at 4 °C (Sorvall RC 5B - Rotor SM 24) and the supernatant was separated and used to quantify the total content of oxidants: reactive oxygen species (ROS), hydrogen peroxide (H₂O₂) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); and enzymatic antioxidants: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSHPx). Total proteins in homogenate were quantified and used to normalize the results [29].

2.7.1. Total ROS measurement

Levels of ROS were quantified by measuring the fluorescence produced through the oxidation of the 2',7'-dichlorofluorescein (DFCH) by the ROS present in the sample [30]. The results were expressed as pmol of ROS per mg of protein.

2.7.2. H₂O₂ concentration

The H₂O₂ levels analysis was based on the oxidation of phenol red by the H₂O₂, mediated by radish peroxidase, resulting in a product that absorbs at 610 nm. The results were expressed in nmol H₂O₂ per mg of protein [31].

2.7.3. TBARS assay

TBARS were measured as previously described [32]. In this method, the thiobarbituric acid (TBA) reacts with the products of lipoperoxidation, producing a compound that is measured at 535 nm. Results were expressed as nmol of TBARS per mg of protein.

2.7.4. SOD activity

The evaluation of SOD activity was based in the inhibition of the pyrogallol autoxidation by SOD present in the samples, which was measured at 420 nm and was expressed as USOD per milligram of protein [33].

2.7.5. CAT activity

Catalase activity was measured by following the decrease in hydrogen peroxide (H₂O₂) absorbance at 240 nm. It was expressed as pmoles of H₂O₂ reduced per minute per milligram of protein [34].

2.7.6. GSHPx activity

The activity of GSHPx was determined by measuring the consumption of NADPH through the reaction of reduction from GSSG to GSH. The results were expressed in nmoles of GSH per minute per milligram of protein [35].

2.8. Western blotting analysis

Western blotting technique was conducted as previously described [36]. Total proteins in homogenate were quantified [29], and 50 µg of protein were submitted to one-dimensional SDS-PAGE in a discontinuous system using 10% (w/v) separating and stacking gels. The primary antibodies used for immunodetection included phosphoserine/threonine-protein kinase 2 (p-Akt2, 56 kDa), total Akt2 (t-Akt2, 56 kDa), phospho-glycogen synthase kinase 3 beta (p-Gsk3β, 47 kDa), and total GSK3β (t-Gsk3β, 47 kDa). Anti-rabbit HRP conjugate was used as secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Autoradiographs of the protein bands were obtained by chemiluminescence and quantitatively measured using the ImageJ software (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). The molecular weights of the bands were determined by reference to a standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range, from Bio-Rad, CA, USA). Results were normalized by the total amount of protein [49].

Table 1
Echocardiographic parameters of LV 48 h after MI.

Parameter	SHAM	MI	MIE	MIH
Total perimeter (cm)	2.16 ± 0.13	2.39 ± 0.18 ^a	2.49 ± 0.17 ^a	2.36 ± 0.18
Infarcted perimeter (cm)	0.00 ± 0.00	1.44 ± 0.20 ^a	1.51 ± 0.11 ^a	1.24 ± 0.19 ^{a,b}
ESD (cm)	0.31 ± 0.02	0.48 ± 0.08 ^a	0.48 ± 0.11 ^a	0.42 ± 0.09 ^a
EDD (cm)	0.60 ± 0.05	0.62 ± 0.05	0.63 ± 0.08	0.58 ± 0.06
FAC (%)	62.62 ± 5.60	31.20 ± 7.38 ^a	27.26 ± 5.28 ^a	34.98 ± 9.32 ^a
FS (%)	48.98 ± 4.45	23.52 ± 7.60 ^a	24.81 ± 9.04 ^a	27.89 ± 10.83 ^a

Results are expressed as mean ± SD. Statistical analysis by One-way ANOVA and Tukey's post hoc. $n = 8$ /group for SHAM, MI and MIE; and 7–8 for MIH group. LV = left ventricle; ESD = End-systolic diameter; EDD = End-diastolic diameter; FAC = Fractional area change; FS = Fractional shortening; EDWS = End-diastolic Wall stress. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = Myocardial Infarction subjected to exercise training; MIH = Myocardial infarction supplemented with T3 and T4 hormones.

^a $P < 0,05$ as compared to SHAM.

^b $P < 0,05$ as compared to MIE.

2.9. Statistical evaluation

The results were tested for normality by Shapiro-Wilk test. Comparison between groups was made using One-way ANOVA and Tukey's post hoc and the significance level was assumed as $< 5\%$ ($P < 0.05$). All statistics were performed using SPSS (Statistical Package for Social Sciences) version 20.0. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD). The artwork was made using Graph Pad Prism 5.

3. Results

3.1. Echocardiography

Basal echocardiography showed that the LV total perimeter was increased in MI and MIE groups, and it was unaltered in MIH as compared to SHAM group (Table 1). The infarcted perimeter was equal in intervention groups (MIE and MIH) as compared to MI group, although it was 18% minor in MIH than in MIE group. The infarct area was nearly 50%, and statistically equal for all infarcted groups (MI, MIE, MIH, data not showed). The infarcted groups had an equal impairment in ESD, EDD, FAC and FS as compared to SHAM group.

Representative images of the final echocardiography measurement of total perimeter, ESD, and EDD are available in Fig. 2. Infarcted groups (MI, MIE and MIH) showed similar impairment in LV total and in infarcted perimeter as compared to SHAM. However, MIH enhanced 6% in total and 14% in infarcted perimeter as compared to MIE (Table 2). ESD and EDD as well as the FS remained prejudiced in all infarcted groups as compared to SHAM group. The FAC was also impaired in infarcted groups as compared to SHAM; however, MIH had an improvement of 48% and 34% when compared to MI and MIE, respectively.

3.2. Femoral artery catheterization

Representative images of the pressure waves acquired from each group are showed in Fig. 3. Although no changes were observed in the HR in infarcted groups as compared to SHAM, an increased HR (31%) was observed in the MIH group as compared to MI (Table 3). No changes in SAP, DAP, MAP, LF [n.u.], HF [n.u.], SAPV-fLF, LF-SAPV and in the alpha LF index were detected between groups. The SAPV-fHF was also unaltered in infarcted groups as compared to SHAM. Nevertheless, the MIH group presented reduced SAPV-fHF (44%) as compared to MIE. The HF-SAPV was similar in SHAM, MI and MIE; and it was increased in MIH as compared to the other groups.

3.3. Hypertrophy measurement

MI, MIE, and MIH presented LV mass increment, and increased LV weight/tibial length index as compared to SHAM group (Table 4). The same result was found in LV/body weight index; however, in this case MIH also presented higher ventricular hypertrophy index as compared to MI (13%) and MIE (11%).

3.4. Histological analysis of fibrosis

Results of Masson's trichrome stain analysis showed predominance (57%) of grade 1 fibrosis in SHAM group, followed by grade 2 (29%), and grade 0 (14%) (Fig. 4). MI group was heterogeneous, equally distributed between grades 1, 2, and 3 (29% each), and a minor percentage (14%) in grade 0. MIE group presented predominantly grade 1 (57%), followed by grade 2 (43%). MIH fibrosis was divided in grades 1, 2 (43% each), and in a minor percentage, grade 3 (14%).

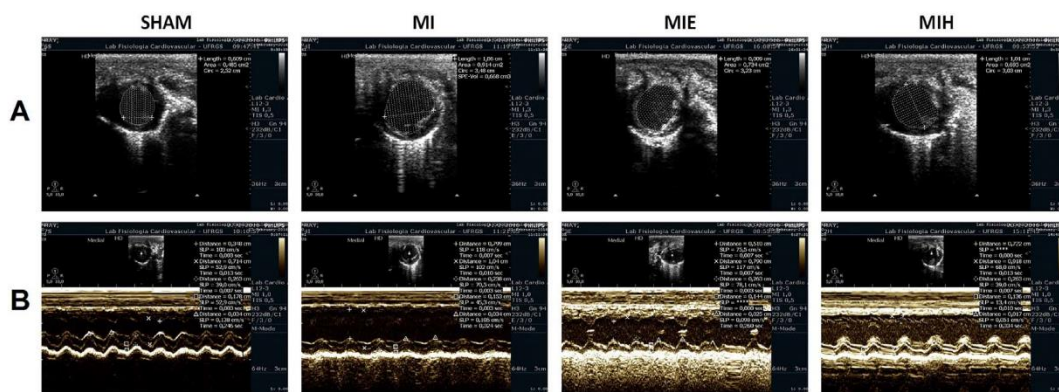


Fig. 2. LV representative image of each studied group 74 days after MI. (A) total perimeter and (B) End-systolic diameter (ESD) and End-diastolic diameter (EDD). Images obtained by echocardiography. ⁺ESD. ^xEDD.

Table 2
Echocardiographic parameters of LV after treatment (74 days after MI).

Parameter	SHAM	MI	MIE	MIH
Total perimeter (cm)	2.51 ± 0.08	3.49 ± 0.18 ^a	3.24 ± 0.20 ^a	3.06 ± 0.28 ^{a,b}
Infarcted perimeter (cm)	0.00 ± 0.00	1.88 ± 0.35 ^a	1.55 ± 0.18 ^a	1.33 ± 0.28 ^{a,b}
ESD (cm)	0.37 ± 0.06	0.83 ± 0.11 ^a	0.75 ± 0.07 ^a	0.72 ± 0.10 ^a
EDD (cm)	0.71 ± 0.04	0.99 ± 0.07 ^a	0.91 ± 0.07 ^a	0.90 ± 0.10 ^a
FAC (%)	68.97 ± 3.88	27.26 ± 4.92 ^a	30.11 ± 4.11 ^a	40.42 ± 9.32 ^{a,b,c}
FS (%)	47.54 ± 7.06	16.66 ± 5.61 ^a	17.59 ± 2.89 ^a	19.86 ± 5.73 ^a

Results are expressed as mean ± SD. Statistical analysis by One-way ANOVA and Tukey's post hoc. *n* = 8/group. LV = left ventricle; ESD = End-systolic diameter; EDD = End-diastolic diameter; FAC = Fractional area change; FS = Fractional shortening; EDWS = End-diastolic Wall stress. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise training; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones.

^a *p* < 0,05 as compared to SHAM.

^b *p* < 0,05 as compared to MI.

^c *p* < 0,05 as compared to MIE.

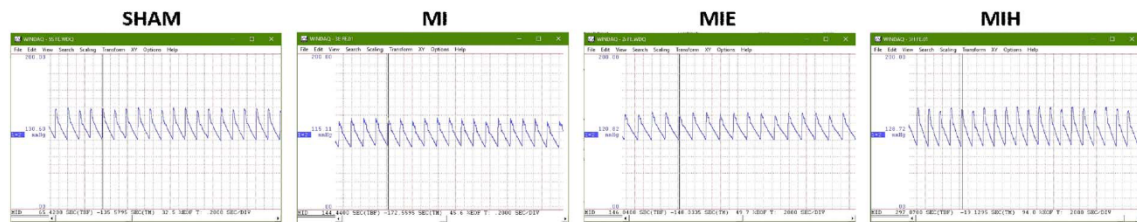


Fig. 3. Representative image of the arterial systolic pressure of each studied group. Images obtained by Windaq Data Acquisition software.

Table 3
Arterial pressure, autonomic modulation and baroreflex sensitivity evaluation.

Parameter	SHAM	MI	MIE	MIH
HR (bpm)	225.16 ± 6.48	219.46 ± 20.22	226.72 ± 37.21	286.55 ± 68.47 ^b
SAP (mmHg)	131.89 ± 17.66	120.98 ± 25.17	115.48 ± 11.12	128.04 ± 23.05
DAP (mmHg)	94.22 ± 16.22	90.91 ± 15.62	83.12 ± 6.99	86.86 ± 18.36
MAP (mmHg)	101.79 ± 9.29	102.41 ± 17.29	96.57 ± 8.48	103.42 ± 14.85
LF [n.u.]	15.44 ± 12.85	23.24 ± 9.03	31.33 ± 21.02	21.33 ± 14.81
HF [n.u.]	84.56 ± 12.85	76.76 ± 9.03	68.67 ± 21.02	78.67 ± 14.81
SAPV-fLF (Hz)	0.49 ± 0.12	0.61 ± 0.07	0.53 ± 0.08	0.59 ± 0.10
SAPV-fHF (Hz)	1180.67 ± 92.55	1308.00 ± 304.42	1319.00 ± 183.70	741.98 ± 699.23 ^c
LF-SAPV (mmHg ²)	0.03 (0.01; 0.05)	0.05 (0.03; 0.09)	0.11 (0.05; 1.31)	0.08 (0.06; 0.12)
HF-SAPV (mmHg ²)	1.30 ± 0.64	1.67 ± 0.66	1.25 ± 0.39	3.42 ± 1.80 ^{a,b,c}
Alpha LF index (ms/mmHg)	7.35 ± 3.13	10.35 ± 6.08	4.91 ± 3.25	3.86 ± 2.27

Parametric results are expressed as mean ± SD and were subjected to statistical analysis by One-way ANOVA and Bonferroni's post hoc. Non-parametric results are expressed as median and percentiles (25,75) and were subjected to statistical analysis by Kruskal-Wallis test. *N* = 5–8/group. HR = heart rate; LF [n.u.] = normalized powers of low frequency; HF [n.u.] = normalized powers of high frequency; MAP = mean arterial pressure; DAP = diastolic arterial pressure; SAP = systolic arterial pressure; SAPV – fLF = central frequency of the LF component of systolic arterial pressure variability; LF-SAPV = low frequency component of the systolic arterial pressure variability; SAPV-fHF = central frequency of the HF component of systolic arterial pressure variability; HF-SAPV = high frequency component of systolic arterial pressure variability. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = Myocardial Infarction subjected to exercise training; MIH = Myocardial infarction supplemented with T3 and T4 hormones.

^a *p* < 0,05 as compared to SHAM.

^b *p* < 0,05 as compared to MI.

^c *p* < 0,05 as compared to MIE.

Table 4
LV hypertrophy analysis.

Measurement	SHAM	MI	MIE	MIH
LV weight (g)	0.78 ± 0.05	0.89 ± 0.06 ^a	0.87 ± 0.07 ^a	0.95 ± 0.06 ^a
LV/Body weight (mg/g)	1.73 ± 0.07	2.00 ± 0.15 ^a	2.04 ± 0.09 ^a	2.26 ± 0.12 ^{a,b,c}
LV/Tibial length (mg/cm)	19.80 ± 1.12	22.64 ± 1.54 ^a	22.38 ± 1.73 ^a	24.62 ± 1.61 ^a

Results are expressed as mean ± SD. Statistical analysis by One-way ANOVA and Tukey's post hoc. *N* = 6–8/group. LV = left ventricle. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise training; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones.

^a *p* < 0,05 as compared to SHAM.

^b *p* < 0,05 as compared to MI.

^c *p* < 0,05 as compared to MIE.

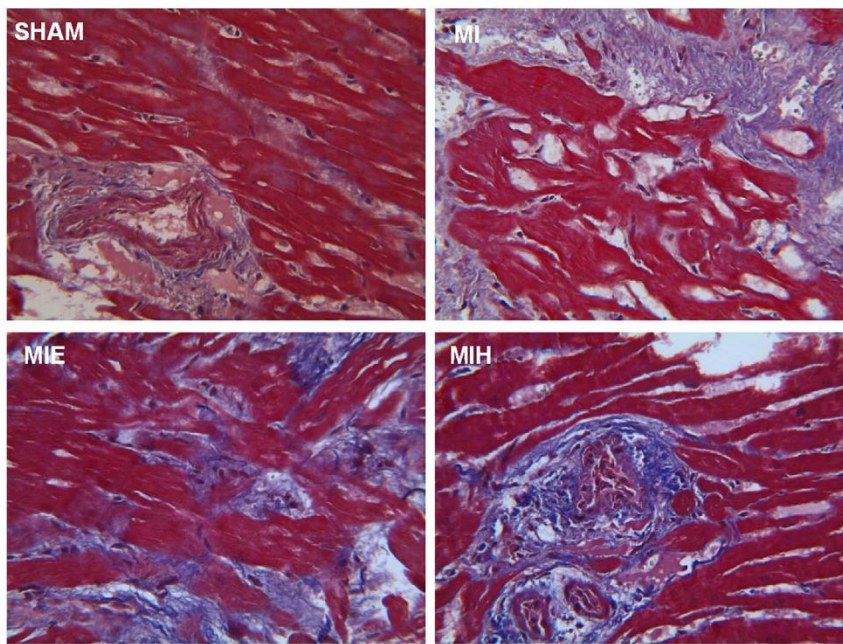


Fig. 4. Fibrosis analysis in the LV by Masson's trichrome staining. Representative image of the grade of fibrosis that was predominant in each studied group. Muscle fibers are red stained, fibrosis areas are blue, and blue stained dots are nuclei's. 400 \times magnification. $n = 7$ /group. LV = left ventricle. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise training; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.5. Oxidative stress analysis

Concerning to the oxidants data, we observed no changes in total ROS and H_2O_2 content in the studied groups (Fig. 5A and B). On the other hand, MIH group demonstrated increased TBARS levels as compared to SHAM, MI, and MIE (Fig. 5C). Regarding the antioxidant defenses, SOD activity decreased by 43% in MIH as compared to MIE group (Fig. 6A). CAT activity was similar between groups (Fig. 6B). Nevertheless, GSHPX activity was depressed by 39% in MIH as compared to MI group (Fig. 6C).

3.6. Western blotting

The protein expression of p-Akt was unchanged but the t-Akt2 was increased in MIH in comparison to SHAM group (Fig. 7). p-Gsk3 β , as well as t-Gsk3 β were unaltered (Fig. 8).

4. Discussion

The benefits of thyroid hormones treatment on the cardiac function post-infarction are nowadays known, both in the combined treatment and in isolated T3 or T4 treatment, either in male or female rats [4–8,37]. One of the major concerns about the use of thyroid hormones is the determination of a safe dose. In this sense, a study showed that a lower dose of T3 had no adverse effects in female rats [8]. Additionally, it was recently showed that a lower dose of T3 and T4 treatment is perfectly capable to induce benefits that are similar to those provided by the aerobic exercise training in male rats, with no adverse effects on the heart rate or T3, T4, and TSH plasma levels [10]. The last point is relevant, since it was demonstrated that T3 and T4 hormones treatment did not alter hypothalamus-pituitary-thyroid axis, using the same experimental protocol of the present study. As well as in other publications, the echocardiography analysis in the present showed that thyroid hormones treatment offered some additional benefits, and therefore, may be as safe as the exercise training after infarction.

The hypertrophy induced by both interventions, as showed by the hypertrophy index, is belief to be beneficial, since both exercise training and thyroid hormones treatment were effective in reduce the fibrosis extension. In fact, a tendency of T4 treatment to reduce the collagen

deposition was previous described [7]. However, it can be observed, in the present study, that exercise training provided more protection against fibrosis development when compared to the thyroid hormones treatment, demonstrating an interesting advantage of exercise training on the cardiac remodeling post-infarction. Additionally, the aerobic exercise training was also shown to provide more protection against raised heart rate. Even though thyroid hormones treated group have shown an increased heart rate as compared to MI group, this functional parameter was not different in MIH group as compared to SHAM or MIE group (measured by catheterization). In this context, the T3 plus T4 concentration used in this study may represent a dose closer to safety for mitigating adverse cardiac remodeling post-infarction. Nevertheless, this could also represent a possible adverse effect if a longer treatment protocol or a higher dose was applied. In this regard, specifically targeted studies in considering the adverse effects of T3 and T4 hormones treatment could be designed, including other control groups, such as SHAM and trained groups treated with T3 and T4 hormones.

On the other hand, according to the catheterization results, the exercise training had no effect on the autonomic modulation, whereas the hormone treatment tends to increase the parasympathetic modulation on the SAPV. This could represent a lusitropic effect in the heart allied with a systemic effect in the vasculature relaxation, which can be mainly explained by the influence that thyroid hormones have on the smooth muscle cells, which are responsible for the contractile properties of blood vessels. This effect can be accompanied by an enhancement of the nitric oxide production, as previously described [38–40]. The vasodilator function of nitric oxide may be a key benefit in the set of the ischemic pathology [41]. By increasing the vascular parasympathetic drive, the thyroid hormones are actually promoting a vasodilation through the nitric oxide induction, then allowing an improvement in the systemic blood perfusion. In this case, a global improvement in the body perfusion can be correlated with a better supply of nutrients to the heart and, therefore, with the improved cardiac performance promoted by T3 and T4 treatment as compared to the exercise training.

Besides its vasodilator function, as a free radical gas the nitric oxide could play a role in the oxidative stress cascade by reacting with the superoxide anion [41,42]. This is not the case though, since previous studies of short-term treatments with T3 and T4 hormones showed

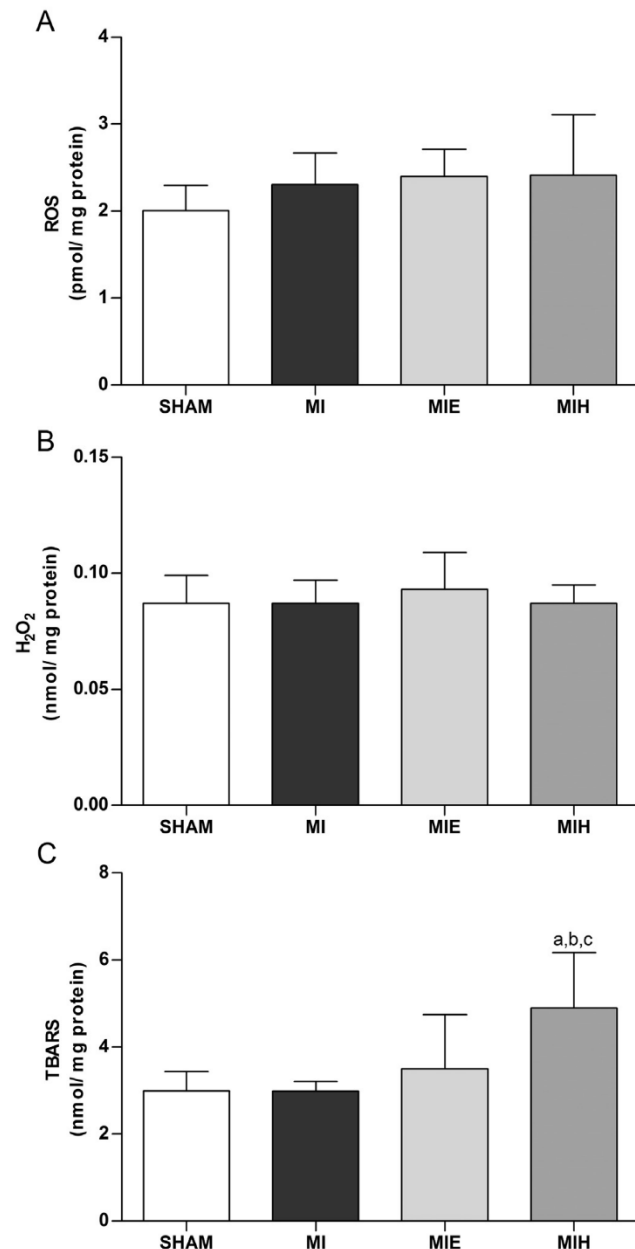


Fig. 5. Oxidative damage in the LV. (A) reactive oxygen species (ROS), (B) oxygen peroxide (H₂O₂), (C) thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). Results are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis by One-way ANOVA and Tukey's post hoc. $n = 8$ /group. LV = left ventricle. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise training; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones. ^a $P < 0,05$ as compared to SHAM. ^b $P < 0,05$ as compared to MI. ^c $P < 0,05$ as compared to MIE.

effectiveness in the oxidative stress reduction [6,43,44]. In our study, although the thyroid hormones treatment did not differ from SHAM antioxidant defenses data, the decrease in GSHPX (vs. MI) and SOD activities (vs. exercise training) could represent a reduction in the antioxidant defenses. Although the ROS levels were unaltered, there was an increase in the lipoperoxidation, which could be explained by the high velocity that ROS can react and generate lipoperoxides. The lipoperoxidation could indicate that treatment protocols longer than this one may be harmful at this or higher doses.

The western blot results indicate a tendency of thyroid hormones treatment to increase the t-Akt2 expression, since it was increased in

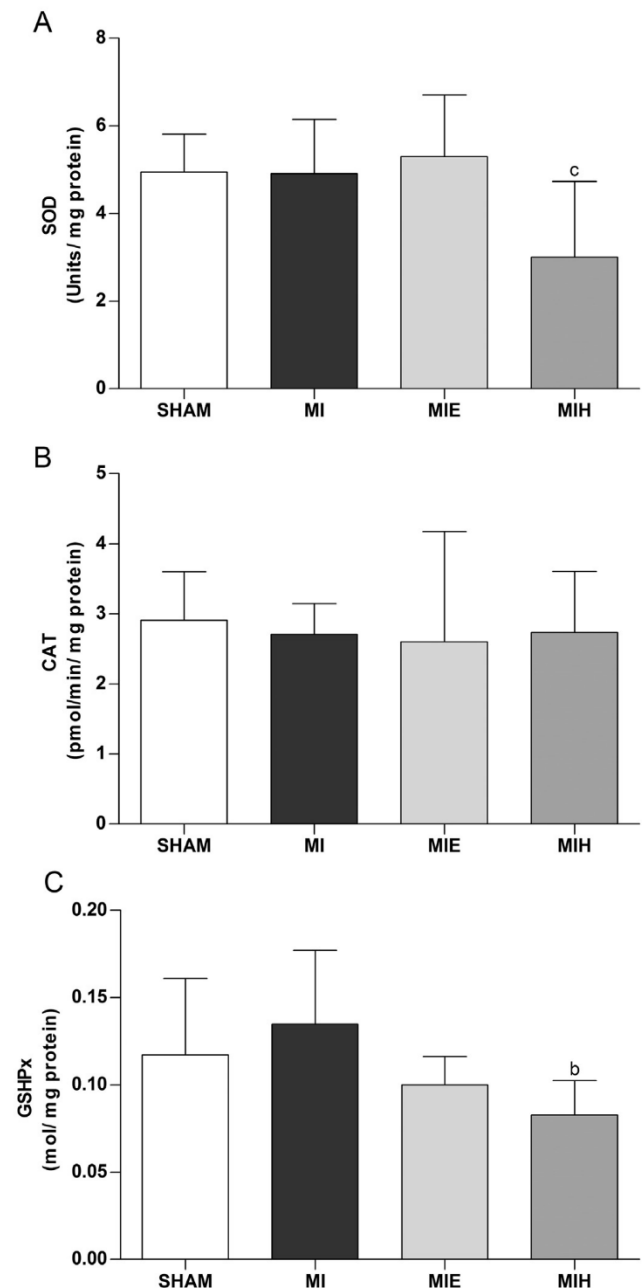


Fig. 6. Antioxidant defenses in the LV. (A) superoxide dismutase (SOD), (B) catalase (CAT), and (C) glutathione peroxidase (GSHPx). Results are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis by One-way ANOVA and Tukey's post hoc. $n = 8$ /group. LV = left ventricle. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise training; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones. ^a $P < 0,05$ as compared to SHAM. ^b $P < 0,05$ as compared to MI. ^c $P < 0,05$ as compared to MIE.

MIH as compared to SHAM, but not when compared to the other infarcted groups. As previously described, the increase of Akt correlates with a cardiac hypertrophy allied to the preservation of systolic function, and it was also reported to be consistent with physiological remodeling at this same stage of treatment [4,45]. The physiological remodeling is reinforced by the unaltered phosphorylation of Akt2 and Gsk3 β , which reflects a stabilized stage of hypertrophy. Also, the increased expression of t-Akt2 reflects a survival signaling promoted by thyroid hormones at this stage, meaning that thyroid hormones provide

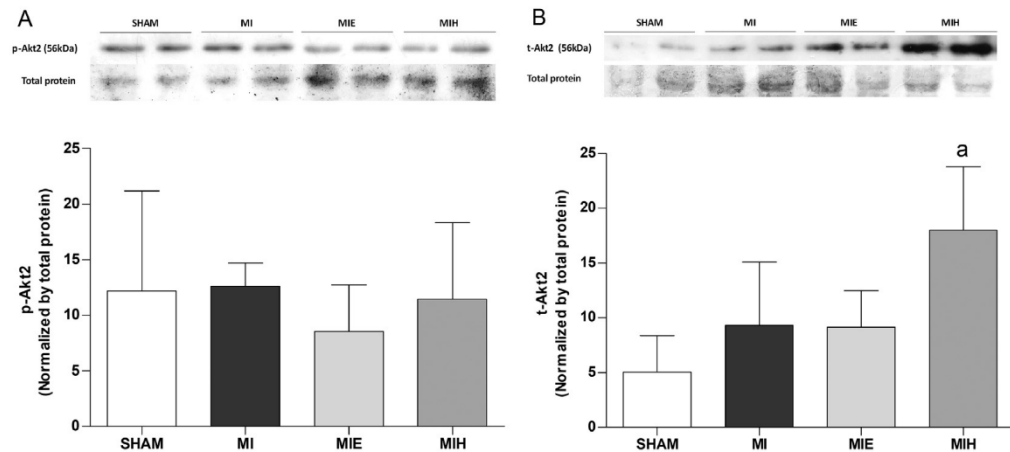


Fig. 7. Analysis of p-Akt2 and t-Akt2. A) p-Akt2. B) t-Akt2. Results were normalized by Ponceau and are expressed as mean \pm SD. $n = 4$ /group. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones. ^a $P < 0.05$ as compared to SHAM.

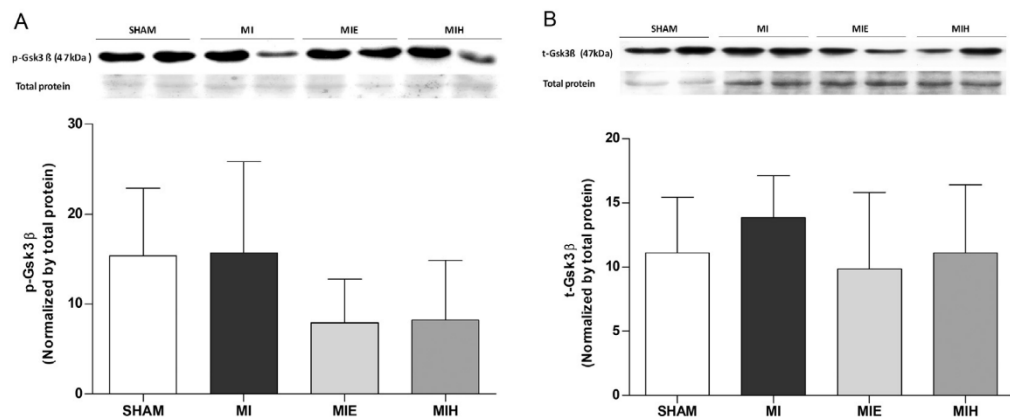


Fig. 8. Analysis of p-Gsk3 β and t-Gsk3 β . A) p-Gsk3 β . B) t-Gsk3 β . Results were normalized by Ponceau and are expressed as mean \pm SD. $n = 4$ /group. Groups: SHAM = SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE = MI subjected to exercise; MIH = MI supplemented with T3 and T4 hormones.

a better reserve against cell death than exercise does.

Although the exercise training was more effective in the fibrosis reduction, the treatment with T3 and T4 hormones was better in improving the cardiac performance by the reduction of cardiac dilation and infarction perimeter, increased the parasympathetic drive and vasodilation, promoted a preservation of the systolic function, and also increased the survival signaling.

Wherefore, the T3 plus T4 hormones treatment was shown to provide benefits comparable and even superior to the ones of the exercise training, and in general could be as safe as the exercise training at this dose. We showed here a differential mechanism of the thyroid hormones to induce improvements in the cardiovascular function after MI by modulating the parasympathetic drive. However, the increased heart rate and the redox unbalance indicates that thyroid hormones treatment probably is unsafe at longer periods, and highlights the requirement and safety of using lower doses, such as the one used in the study of Rajagopalan and colleagues [8]. Although thyroid hormone's beneficial effects are well described in the LV, more research is required to investigate its effects in the function of other organs, such as the right ventricle and the skeletal musculature.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Financial support

Scholarship from CNPq (grant number 142025/2015-1).

Acknowledgements

Professor Iraci Torres, who provided the treadmill. Statistical support by professor Maria Beatriz Ferreira. Technician support from Tânia Regina Gatelli Fernandes-Piedras. Veterinary support from Dr. André Ricardo Ribeiro Belló.

References

- [1] W. Xuan, W. Huang, R. Wang, C. Chen, Y. Chen, Y. Wang, X. Tan, Elevated circulating IL-32 presents a poor prognostic outcome in patients with heart failure after myocardial infarction, *Int. J. Cardiol.* 243 (2017) 367–373, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.03.065>.
- [2] A.S. Bhatt, A.P. Ambrosy, E.J. Velazquez, Adverse remodeling and reverse remodeling after myocardial infarction, *Curr. Cardiol. Rep.* 19 (2017) 71, <http://dx.doi.org/10.1007/s11886-017-0876-4>.
- [3] Z. Liu, H.-Y. Liu, H. Zhou, Q. Zhan, W. Lai, Q. Zeng, H. Ren, D. Xu, Moderate-intensity exercise affects gut microbiome composition and influences cardiac function in myocardial infarction mice, *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1687, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01687>.
- [4] I. Mourouzis, I. Giagourta, G. Galanopoulos, P. Mantzouratou, E. Kostakou, A.D. Kokkinos, N. Tentolouris, C. Pantos, Thyroid hormone improves the mechanical performance of the post-infarcted diabetic myocardium: a response associated with up-regulation of Akt/mTOR and AMPK activation, *Metabolism* 62 (2013) 1387–1393, <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2013.05.008>.
- [5] C. Pantos, I. Mourouzis, K. Markakis, N. Tsigoulis, M. Panagiotou, D.V. Cokkinos,

- Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats, *Basic Res. Cardiol.* 103 (2008) 308–318, <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-008-0697-0>.
- [6] A.L. de Castro, R.O. Fernandes, V.D. Ortiz, C. Campos, J.H.P. Bonetto, T.R.G. Fernandes, A. Conzatti, R. Siqueira, A.V. Tavares, P.C. Schenkel, A. Belló-Klein, A.S. da Rosa Araujo, Thyroid hormones improve cardiac function and decrease expression of pro-apoptotic proteins in the heart of rats 14 days after infarction, *Apoptosis* 21 (2016) 184–194, <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-015-1204-3>.
- [7] Y.-F. Chen, N.Y. Weltman, X. Li, S. Youmans, D. Krause, A.M. Gerdes, Improvement of left ventricular remodeling after myocardial infarction with eight weeks L-thyroxine treatment in rats, *J. Transl. Med.* 11 (2013) 40, <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-11-40>.
- [8] J.-L. Chen, H.-W. Chiu, Y.-J. Tseng, W.-C. Chu, Hyperthyroidism is characterized by both increased sympathetic and decreased vagal modulation of heart rate: evidence from spectral analysis of heart rate variability, *Clin. Endocrinol.* 64 (2006) 611–616, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2265.2006.02514.x>.
- [9] M.T. Elnakish, A.A.E. Ahmed, P.J. Mohler, P.M.L. Janssen, Role of oxidative stress in thyroid hormone-induced cardiomyocyte hypertrophy and associated cardiac dysfunction: an undisclosed story, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2015 (2015) 1–16, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/854265>.
- [10] V. Rajagopalan, Y. Zhang, K. Ojamaa, Y. Chen, A. Pingitore, C.J. Pol, D. Saunders, K. Balasubramanian, R.A. Towner, A.M. Gerdes, Safe oral Triiodo-L-Thyronine therapy protects from post-infarct cardiac dysfunction and arrhythmias without cardiovascular adverse effects, *PLoS One* 11 (2016) e0151413, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0151413>.
- [11] V. Rajagopalan, Y. Zhang, C. Pol, C. Costello, S. Seitter, A. Lehto, O.V. Savinova, Y. Chen, A.M. Gerdes, Modified low-dose Triiodo-L-thyronine therapy safely improves function following myocardial ischemia-reperfusion injury, *Front. Physiol.* 8 (2017) 225, <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2017.00225>.
- [12] R.B. Teixeira, A. Zimmer, A.L. de Castro, B.G. de Lima-Seolin, P. Türck, R. Siqueira, A. Belló-Klein, P.K. Singal, A.S. da Rosa Araujo, Long-term T3 and T4 treatment as an alternative to aerobic exercise training in improving cardiac function post-myocardial infarction, *Biomed Pharmacother* 95 (2017) 965–973, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.021>.
- [13] T.N.P. JOHNS, B.J. OLSON, Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals, *Ann. Surg.* 140 (1954) 675–682 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13208115>, Accessed date: 8 August 2017.
- [14] M.L. Batista, R.V.T. Santos, E.M. Oliveira, M.C.L. Seelaender, L.F.B.P. Costa Rosa, Endurance training restores peritoneal macrophage function in post-MI congestive heart failure rats, *J. Appl. Physiol.* 102 (2007) 2033–2039, <http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00871.2006>.
- [15] X. Xu, W. Wan, L. Ji, S. Lao, A.S. Powers, W. Zhao, J.M. Erikson, J.Q. Zhang, Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodeling in rats, *Cardiovasc. Res.* 78 (2008) 523–532, <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvn028>.
- [16] Y. Wang, S. Wang, W.G. Wier, Q. Zhang, H. Jiang, Q. Li, S. Chen, Z. Tian, Y. Li, X. Yu, M. Zhao, J. Liu, J. Yang, J. Zhang, W. Zang, Exercise improves the dilatation function of mesenteric arteries in postmyocardial infarction rats via a PI3K/Akt/eNOS pathway-mediated mechanism, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 299 (2010) H2097–106, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00701.2010>.
- [17] B. Rodrigues, D.M. Figueroa, C.T. Mostarda, M.V. Heeren, M.-C. Irigoyen, K. De Angelis, Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats, *Cardiovasc. Diabetol.* 6 (2007) 38, <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2840-6-38>.
- [18] E. Nozawa, R.M. Kanashiro, N. Murad, A.C.C. Carvalho, S.L.D. Cravo, O. Campos, P.J.F. Tucci, V.A. Moises, et al., Brazilian J. Med. Biol. Res. = Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol. 39 (2006) 687–695, <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2006000500016>.
- [19] A.M.V. Tavares, A.S. da Rosa Araújo, G. Baldo, U. Matte, N. Khaper, A. Belló-Klein, L.E. Rohde, N. Clausell, Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction, *Life Sci.* 87 (2010) 699–706, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2010.10.008>.
- [20] A.P.O.N. Peron, R.M. Saraiva, E.L. Antonio, P.J.F. Tucci, A função mecânica do miocárdio remanescente a um infarto do miocárdio é normal durante o período de cicatrização, embora exista insuficiência cardíaca, *Arq. Bras. Cardiol.* 86 (2006) 105–112, <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2006000200005>.
- [21] A. Malliani, M. Pagani, F. Lombardi, S. Cerutti, Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain, *Circulation* 84 (1991) 482–492 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1860193> (accessed August 9, 2017).
- [22] N. Montano, T.G. Ruscone, A. Porta, F. Lombardi, M. Pagani, A. Malliani, Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt, *Circulation* 90 (1994) 1826–1831 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7923668>, Accessed date: 9 August 2017.
- [23] A.G. Casali, K.R. Casali, The SiSyPhus Project: BioMedical Data Analysis Package, (2007).
- [24] G. Mancica, G. Grassi, C. Giannattasio, G. Seravalle, Sympathetic activation in the pathogenesis of hypertension and progression of organ damage, *Hypertension* 34 (1999) 724–728 (Dallas, Tex. 1979), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523349>, Accessed date: 9 August 2017.
- [25] G. Baselli, S. Cerutti, F. Badilini, L. Biancardi, A. Porta, M. Pagani, F. Lombardi, O. Rimoldi, R. Furlan, A. Malliani, Model for the assessment of heart period and arterial pressure variability interactions and of respiration influences, *Med. Biol. Eng. Comput.* 32 (1994) 143–152 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8022210> (accessed August 9, 2017).
- [26] M. Pagani, G. Malfatto, S. Pierini, R. Casati, A.M. Masu, M. Poli, S. Guzzetti, F. Lombardi, S. Cerutti, A. Malliani, Spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy, *J. Auton. Nerv. Syst.* 23 (1988) 143–153 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3049759> (accessed August 9, 2017).
- [27] L.W. Hu, L.A. Benvenuti, E.A. Liberti, M.S. Carneiro-Ramos, M.L.M. Barreto-Chaves, Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling, *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 285 (2003) R1473–R1480, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpregu.00269.2003>.
- [28] F.C. Yin, H.A. Spurgeon, K. Rakusan, M.L. Weisfeldt, E.G. Lakatta, Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat, *Am. J. Phys.* 243 (1982) H941–7 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6216817> (accessed August 8, 2017).
- [29] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>, Accessed date: 8 August 2017.
- [30] C.P. LeBel, H. Ischiropoulos, S.C. Bondy, Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem. Res. Toxicol.* 5 (1992) 227–231 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1322737>, Accessed date: 9 August 2017.
- [31] E. Pick, Y. Keisari, A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture, *J. Immunol. Methods* 38 (1980) 161–170 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6778929> (accessed August 9, 2017).
- [32] J.A. Buege, S.D. Aust, Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.* 52 (1978) 302–310 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633> (accessed August 9, 2017).
- [33] S.L. Marklund, Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice, *Mutat. Res.* 148 (1985) 129–134 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3969077> (accessed August 9, 2017).
- [34] H. Aebi, Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660> (accessed August 9, 2017).
- [35] L. Flohé, W.A. Günzler, Assays of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 105 (1984) 114–121 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727659> (accessed August 9, 2017).
- [36] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063> (accessed August 9, 2017).
- [37] C. Kalofoutis, I. Mourouzis, G. Galanopoulos, A. Dimopoulos, P. Perimenis, D. Spanou, D.V. Cokinos, J. Singh, C. Pantos, Thyroid hormone can favorably remodel the diabetic myocardium after acute myocardial infarction, *Mol. Cell. Biochem.* 345 (2010) 161–169, <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0569-4>.
- [38] G. Nicolini, L. Pitto, C. Kusmic, S. Balzan, L. Sabatino, G. Iervasi, F. Forini, New insights into mechanisms of cardioprotection mediated by thyroid hormones, *J. Thyroid. Res.* 2013 (2013) 1–9, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/264387>.
- [39] A. Makino, H. Wang, B.T. Scott, J.X.-J. Yuan, W.H. Dillmann, Thyroid hormone receptor- and vascular function, *AJP Cell Physiol.* 302 (2012) C1346–C1352, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00292.2011>.
- [40] A. Colantuoni, P.L. Marchiafava, D. Lapi, F.S. Forini, G. Iervasi, Effects of tetraiodothyronine and triiodothyronine on hamster cheek pouch microcirculation, *AJP Hear. Circ. Physiol.* 288 (2004) H1931–H1936, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00931.2004>.
- [41] R.K. Mistry, A.C. Brewer, Redox regulation of gasotransmission in the vascular system: a focus on, *Angiogenesis* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.025>.
- [42] D. Moris, M. Spartalis, E. Tzatzaki, E. Spartalis, G.-S. Karachaliou, A.S. Triantafyllis, G.I. Karaolani, D.I. Tsilimigras, S. Theocharis, The role of reactive oxygen species in myocardial redox signaling and regulation, *Ann. Transl. Med.* 5 (2017) 324, <http://dx.doi.org/10.21037/atm.2017.06.17>.
- [43] A.L. De Castro, A.V. Tavares, C. Campos, R.O. Fernandes, R. Siqueira, A. Conzatti, A.M. Bicca, T.R.G. Fernandes, C.L. Sartório, P.C. Schenkel, A. Belló-Klein, A.S. da Rosa Araujo, Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction, *Mol. Cell. Endocrinol.* 391 (2014) 22–29, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.04.010>.
- [44] A.L. de Castro, A.V. Tavares, R.O. Fernandes, C. Campos, A. Conzatti, R. Siqueira, T.R.G. Fernandes, P.C. Schenkel, C.L. Sartório, S. Llesuy, A. Belló-Klein, A.S. da Rosa Araujo, T3 and T4 decrease ROS levels and increase endothelial nitric oxide synthase expression in the myocardium of infarcted rats, *Mol. Cell. Biochem.* 408 (2015) 235–243, <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-015-2501-4>.
- [45] T. Matsui, L. Li, J.C. Wu, S.A. Cook, T. Nagoshi, M.H. Picard, R. Liao, A. Rosenzweig, Phenotypic Spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 22896–22901, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M200347200>.
- [46] R.D. Lillie, H.M. Fulmer, *Histopathologic technic and practical histochemistry*, Mc Graw-Hill, New York, 1976 (942p.).
- [47] L.G. Luna, *Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, 3rd edition, McGraw Hill, New York, 1968.
- [48] P. Masson, Some histological methods. Trichrome stainings and their preliminary technique, *Bull. Int. Assoc. Med.* 12 (1929) 75–90.
- [49] D. Klein, R.M. Kern, R.Z. Sokol, A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36 (1) (1995) 59–66.

6.3 Artigo 3 – versão parcial

Título: Thyroid hormones treatment preserves the treadmill exercise performance of infarcted rats through enhancement of cardiopulmonary parameters and induction of skeletal muscle hypertrophy

Revista: Ainda não definida.

Thyroid hormones treatment preserves the treadmill exercise performance of infarcted rats through enhancement of cardiopulmonary parameters and induction of skeletal muscle hypertrophy

Authors: Rayane Brinck Teixeira¹, Alexsandra Zimmer¹, Alessandra Eifler Guerra Godoy², Francielle Veloso Pinto Pereira¹, Alexandre Luz de Castro¹, Débora Santos Rocha¹, Ingrid Gonçalves Machuca Dias³, Karina Rabello Casali³, Adriane Belló-Klein¹, Alex Sander da Rosa Araujo¹

¹Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Research Institute for Multicenter Studies (IPCEM), University of Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, RS, Brazil.

³ Institute of Science and Technology (ICT), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil.

Corresponding author:

Dr. Alex Sander da Rosa Araujo

Address: Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, sala 344, CEP 90050170, Porto Alegre, RS, Brazil. Tel.: +55 (51) 3308 3621; fax: +55 2151 33083656. E-mail address: alex.rosa@ufrgs.br

Abstract

Aim: This study aimed to investigate whether a low dose of T3 joint to T4 hormone, as well as the exercise training, can influence functional and biochemistry parameters in the right ventricle, lung, and gastrocnemius after myocardial infarction. **Material and methods:** Male Wistar rats were divided in four groups (n=8/group): SHAM (SHAM operated), MI (infarcted), MIE (exercise training on a treadmill for 9 weeks, starting 1-week post-infarction), and MIH (treated with low dose of T3 and T4 hormones for 9 weeks, starting 1-week post-infarction). Left ventricle echocardiography was performed 48 hours and 10 weeks after infarction. The exercise performance test was accessed 1, 4, and 10 weeks after infarction. Then, rats were subjected to femoral artery catheterization, and morphometry and oxidative stress were analyzed in the right ventricle, lung, and gastrocnemius. Glycogen content was measured in the lung and gastrocnemius. Macrophages and inflammatory infiltrate were evaluated in the lung, whereas gastrocnemius was checked for hypertrophy by histology. **Results:** MIE and MIH presented better cardiac function as compared to MI group. MIE and MIH groups had greater final exercise performance than SHAM and MI. MIE and MIH had increased H₂O₂ and macrophages number in the lung as compared to MI. MIH improved the gastrocnemius sulfhydryl content as compared to MI and MIE. Both MIE and MIH presented gastrocnemius hypertrophy. **Conclusion:** Both interventions provide an equal outcome in terms of physical performance. Therefore, low-dose thyroid hormones treatment could be a safe alternative to the exercise training in cases of exercise intolerance.

Keywords: Myocardial infarction, Thyroid hormones treatment, oxidative stress, skeletal muscle hypertrophy, physical capacity

1 Introduction

Recent researches have brought to the light the possible benefits of thyroid hormone treatments on the left ventricle (LV) remodeling after myocardial infarction (MI) [1–3]. It seems that lower doses of either T3, or T3 plus T4 combined treatment

are able to provide benefits without adverse effects on the heart rate and thyroid hormone levels [4–6].

It was recently evidenced by our group that the low dose of T3 plus T4 combined treatment results in beneficial effects that are alike those promoted by the exercise training after myocardial infarction [6,7]. This therapeutic approach could represent an alternative for a coadjutant treatment in those cases in which patients develop exercise intolerance. In addition, there is a paucity of researches in order to investigate if thyroid hormone treatments can actually promote exercise tolerance after myocardial infarction. Moreover, in its majority, the literature data have focused only on the study of the thyroid hormone treatments effects on cardiac function, specifically on the LV.

However, thyroid hormones exert both targeted-organ and systemic effects. Therefore, the effects of thyroid hormone treatments on other organs and to the vasculature remained to be investigated.

The present study targeted to address if T3 plus T4 treatment given after the MI can promote remote effects on other tissues besides the LV, as well as either its effects are comparable to those of the exercise training in the different tissues.

2 Material and Methods

2.1 Ethics compliance

The present study was evaluated and approved by the ethics committee on the use of animals of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul by the protocol number 29521. All procedures in the study were held with strictly respect to the animal's welfare as well as the National Institute of Health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

2.2 Experimental protocol

The figure 1 illustrates the experimental protocol adopted in the present study. A N of 40 male Wistar rats was used in the study. Of these, 8 rats were assigned to a SHAM-operated control group (named SHAM). The 32 other rats were designed to

infarcted groups and, therefore, subjected to MI induction surgery. The infarction area was quantified by echocardiography 48 hours after the surgery, and rats who either died or had less than 20% of infarction area were not considered in the study. The remaining infarcted rats were randomly selected to either MI control group (named MI), MI followed by exercise training (named MIE), or MI followed by T3 and T4 hormones combined treatment (named MIH); n=8/group. The exercise training as well as T3 and T4 treatment were initiated 1 week and finished 10 weeks after MI surgery, whilst SHAM and MI groups had no intervention. The LV function was accessed by echocardiography in all the four groups both 48 hours and 74 days after MI surgery. Following the echocardiography at 74th day, each animal was subjected to femoral artery catheterization. All rats were anesthetized prior to echocardiography (ketamin 90 mg/kg and xilazin 10mg/kg) and received an additional partial dose prior to catheterization, if necessary (ketamin 30 mg/kg and xilazin 3 mg/kg). Thereafter, animals were euthanized by anesthesia overload (ketamin 90 mg/ kg and xilazin 10mg/ kg), followed by cervical dislocation. The sampled tissues were the LV, RV, lung, gastrocnemius and tibia, which were maintained at - 80°C until the occasion of analysis. Each rat had also one part of its lung and gastrocnemius collected and placed in formalin 10% for histological analysis.

2.2.1 MI induction or SHAM surgery

The surgery to induce MI proceeded as previously described [8]. Rats were anesthetized (Ketamin 90 mg/ kg and Xilazin 10mg/ kg), placed on a surgical bed for rats and subjected to artificial ventilation (Harvard apparatus, US). For rats in MI group, a 6-0 line was used for the suture of the left anterior descending coronary artery. In the rats in SHAM group, the line was only passed by, without suture. The post-surgery care included tramadol 12.5 mg/kg injected subcutaneously, and oral dipyron 200 mg/kg, both administered each 12 hours for two days.

2.2.2 Exercise Training protocol

The exercise training protocol was conducted on a treadmill adapted for rats (Imbramed TK-01). It was started one week after MI surgery and lasted for nine weeks.

All rats underwent four days of treadmill adaptation, both one week before and after the surgery, by walking at the constant velocity of 0.3 km/h for 15 minutes. After the second adaptation, all rats were subjected to a maximum exercise test (MET) [9,10]. The exercise training protocol was then prescribed only for MIE group, based exclusively on its specific results. The treadmill training protocol consisted in five weekly sessions for 8 weeks, with graduate increases on the duration and velocity until reach 60 minutes and 40% of the MET velocity [11,12]. At the fourth week of training, a new MET was conducted for all groups, and the results of MIE group were used to adjust the training workload. At the end of the protocol, SHAM, MI and MIH groups were subjected to a new adaptation and a final MET was performed for all the four groups. The initial, middle, and final MET scores were used to compare the exercise capacity evolution of each group.

2.2.3 Treatment with combined solution of T3 and T4 hormones

T3 and T4 hormones treatment begun one week after MI surgery and lasted for 9 weeks. During this time, rats of MIH group received a daily dose, by gavage, of saline solution containing T3 (1.2 µg/100g of body weight) and T4 (4.8 µg/100g of body weight) hormones, whilst SHAM, MI and MIE groups received just the vehicle. The T3 and T4 solution was prepared once in a week in a dark room. T3 and T4 powder were weighed separately, then dissolved together in 300µL of 1N sodium hydroxide (NaOH) and diluted in saline solution, with the final pH adjusted to 7.0. The vehicle solution contained only 300µL of 1N NaOH diluted in saline solution and a final pH=7.0.

2.3 Analysis

2.3.1 LV Echocardiography

The transthoracic echocardiography was performed 48 hours after surgery to access the LV function and it was repeated 74 days after the surgery (at the end of the study). Data were acquired in 2D and in M-mode at basal, medial and apical levels, using a S12-13 transducer (Philips, Andover, MA, USA). The following parameters were accessed: Infarction area, systolic transverse area (cm²), diastolic transverse

area (cm²), systolic output (SO, ml), systolic parasternal length (cm) and diastolic parasternal length (cm). The End-diastolic Wall stress index (LVEDWS index) was obtained only at the final echocardiography. All results were obtained according to methods previously described [13–15].

2.3.2 Femoral artery catheterization

Following the final echocardiography, the rats underwent catheterization of the right femoral artery and the artery pressure waves were recorded for 2 minutes in a sound-attenuated room, using a pressure transducer (Strain-Gauge Narco Biosystem Miniature Pulse Transducer RP-155; Houston, Texas) connected to an amplifier (HP 8805C, Hewlett Packard). The data were acquired by Windaq software, with 2 kHz sampling frequency (Dataq Instruments, Inc., Akron, Ohio, EUA). Rats were monitored, and an additional dose of anesthesia (Ketamin 30 mg/kg and xilazin 3 mg/kg) was administered if necessary.

300 stable pressure waves were used to analyze the heart rate variability (HRV) and the systolic arterial pressure variability (SAPV). In the HRV domain were analyzed the HRV, the central frequency of the LF component of heart rate variability (HRV-fLF), the central frequency of the HF component of heart rate variability (HRV-fHF), the absolute powers of low frequency (LF [abs]), the absolute powers of high frequency (HF [abs]), and the ratio between low frequency and high frequency powers (LF/HF). In the SAPV domain were analyzed the SAPV and the very low frequency component of the systolic arterial pressure variability (VLF-SAPV) [16–18].

2.3.3 Morphometric analysis

The body weight of each rat was verified weekly during the study. After the catheterization, each rat was euthanized and had its heart, lung, gastrocnemius muscle and tibia collected. Heart, LV, LV scar, RV, lung and gastrocnemius were weighed, and the tibial length was measured. Hypertrophy indices were measured in the RV, lung and gastrocnemius by its relation to both body weight (mg/g) and tibial length (mg/cm) [19,20].

2.3.4 Oxidative stress analysis

The redox status was verified in the RV, lung and gastrocnemius. The tissue (30 mg) was homogenized, by using a Polytron homogenizer, for 40 seconds in 1,15% potassium chloride (KCl) and 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). In addition, 50 µl of Triton X were added for each 50 mg of tissue, only for the gastrocnemius samples. Then, the homogenate was centrifuged for 15 minutes at 20000 rpm and 4°C (Sorvall RC 5B - Rotor SM 24) and the supernatant was used for oxidative stress measurements.

The concentration of hydrogen peroxide (H₂O₂) was measured at 630 nm and the results were expressed as nmol/ mg of protein [21]. Sulfhydryl content was measured at 412 nm and the results are described as µmol/mg of protein [22,23]. The content of protein was measured to normalize the results [24].

2.3.5 Glycogen content

The glycogen content was measured in the lung and gastrocnemius using the Glicose-Liquiform kit (Labtest Diagnóstica S.A., Brazil). The dosage was made on the basis of Van Handel's method [25]. 100 mg of tissue were used for each rat. The results are showed as mg/g of tissue.

2.3.6 Lung and gastrocnemius histology

Slices of lung and gastrocnemius were cut transversely. The pieces were immediately immersed in 4% tamponed formalin for 24 hours. Then, the samples were processed overnight for paraffin inclusion. The tissue was then sliced into 3 µm thickness, fixed in the slide and stained by Hematoxylin-Eosin method [26–28]. The slides were evaluated by a pathologist, using the Opticam microscope, model 0500R (Opticam Microscopy Technology, USA). The lung was analyzed for the presence of macrophages and inflammatory infiltration. Gastrocnemius samples were evaluated for fiber hypertrophy. The results were qualitatively graded as absent, low, moderate, or accentuated. Images were obtained by a microscope-accoupled camera, model LOPT14003 (Opticam Microscopy Technology, USA).

2.3.7 Statistical analysis

All the statistic tests were performed using SPSS version 20.0. The normality of results was assessed by Shapiro-Wilk test. Parametric results were then tested by One-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc, and were described as average \pm standard deviation. Non-parametric results were tested by Kruskal-Wallis, followed by pairwise comparisons, and were described as median and interquartile ranges of 25 and 75. Results of body weight were analyzed by repeated measures ANOVA. Artwork was produced using GraphPad Prism 5 and SMART - Servier Medical Art.

3 Results

3.1 Body weight and MET Performance

As showed in the Figure 2A, there was no difference between groups in the body weight over the experimental protocol. The first MET results did not differ among the groups (Fig. 2B). MIE group had a better performance in the middle MET and presented an increased time until exhaustion as compared to SHAM and MI groups (Fig. 2B and C, respectively). At the final MET, both MIE and MIH groups achieved a better performance as compared to SHAM and MI (Fig. 2B). In addition, MIE group also presented increased time until exhaustion as compared to SHAM and MI groups in the final MET (Fig. 2C).

3.2 Echocardiography

After 48 hours from MI induction surgery, the echocardiography showed approximately 50% of infarction area for all infarcted groups (MI, MIE, and MIH), as previously reported [6]. Results of LV echocardiography are presented in table 1 and figure 3. 48 hours after the surgery, all infarcted groups had a worsening in the systolic transverse area when compared to SHAM group (Fig. 3A and B). MI and MIE groups also presented increased diastolic transverse area and systolic parasternal length as

compared to SHAM (Table 1). The systolic output was reduced only in MI group as compared to SHAM. Diastolic parasternal length was unaltered (Table 1).

At the final echocardiographic assessment, all infarcted groups presented increased systolic transverse area (Fig. 3A and B). However, the systolic transverse area was partially recovered in MIH group as compared to MI (Fig. 3A and C). Diastolic transverse area and systolic parasternal length remained impaired in MI and MIE when compared to SHAM group. The diastolic parasternal length increased only in MI group as compared to SHAM. The LVEDWS index was increased in MI as compared to SHAM group. Both MIE and MIH presented a recovery on LVEDWS index as compared to MI group. The systolic output had no alteration (Table 1).

3.3 Heart rate and systolic pressure variability evaluation

The analyses of heart rate and systolic pressure variability showed no differences among groups for the HRV, HRV-fLF, HRV-fHF, LF [abs], HF [abs], LF/HF index, SAPV, or VLF-SAPV. Results are available at table 2.

3.4 Heart, lung, and gastrocnemius morphometry

The LV weight, scar weight, LV/heart weight, RV weight, RV/ heart weight, RV/LV weight, RV/body weight, RV/tibial length, Lung weight, Lung/body weight, Lung/tibial length, Gastrocnemius weight, and Gastrocnemius/body weight relation showed no changes among groups. However, the gastrocnemius/ tibial length ratio was reduced in MIH as compared to SHAM group (Table 3).

3.5 Oxidative stress analysis

Neither H₂O₂ nor sulfhydryl content in the RV were changed (Fig. 4A and B). There was an increased amount of H₂O₂ in the lung in both MIE and MIH as compared to MI, and MIH was also increased as compared to SHAM group (Fig. 4C). However, the sulfhydryl content in the lung had no changes (Fig. 4D). The H₂O₂ was unaltered in gastrocnemius muscle (Fig. 4E). However, the gastrocnemius of MIH group presented increased sulfhydryl content when compared to MI and MIE (Fig. 4F).

3.6 Glycogen content

As showed in the figure 5, the glycogen content was unaltered in both lung and gastrocnemius.

3.7 Histology

Results of histology are showed in the Table 4 and Figure 6. The lung had low to moderate presence of macrophages in SHAM group, while MI group had mostly low, and accentuated in a minor percentage. The trained group presented the same result as SHAM, while the MIH group showed moderate presence in most cases, and a minor percentage was graded as low. The inflammatory infiltrate was considered as low in majority, and moderate in a minor percentage in SHAM group. The MI group showed elevated inflammation, distributed mostly in low and moderate grades, and a minor portion was accentuated. MIE had predominance of moderate inflammation, and a small portion was low. MIH was equally divided in low and moderate grade.

For the gastrocnemius, both SHAM and MI groups had no hypertrophy. The hypertrophy was also absent in most of MIE samples, however, 42.86% had low hypertrophy level. MIH presented a minority of samples with absence or accentuated hypertrophy, and the great majority (83%) was classified as low.

4 Discussion

The present study shows that alike to the exercise training, thyroid hormones treatment at low doses is capable to promote benefits not only on the cardiac function, but also to remote organs, such as lung and skeletal musculature. Taken together, all these benefits can mediate the enhancement in the physical performance.

The echocardiographic results showed that thyroid hormones treatment at low doses had an additional benefit by partially preventing the LV dilation, evidenced by the reduction of systolic transverse area. This result reinforces our previous findings [7]. As in the previous comparative studies, both exercise training and thyroid hormones were equally able to partially protect the LV from maladaptive remodeling

and contractile impairment [6,7]. On the other hand, contrarily to previous reports regarding thyroid hormones effects on the RV, both interventions in this study did not alter RV function parameters after MI [29]. This could otherwise mean that differing from higher doses at short-term treatments, lower doses of T3 and T4, even for long-term, may not promote significative effects or does not affect the RV function.

Regarding the vascular function, we have previously reported that thyroid hormones treatment improves the autonomic modulation of arterial pressure variability [7]. However, no additional effects on vascular function were found in the present study. On the other hand, this study describes for the first time that low-dose T3 and T4 treatment is capable to improve the exercise performance in the same way that exercise training post-infarction. It is possible that thyroid hormones dosage used in this study can activate the same or similar signaling pathways that exercise, given that great part of exercise training benefits is mediated through its effects on thyroid hormones signaling [30,31]. Even though the exercise training itself has been studied in order to promote exercise tolerance, this result could indicate an alternative approach to enhance the physical capacity, to be used only in those cases where infarcted patients develop exercise intolerance and the exercise is unable to reverse it [32,33].

The changes in pulmonary and skeletal muscle parameters found in this study, together with LV function improvement, can be responsible for the enhanced exercise capacity found in thyroid hormones treated group. In this sense, the increased production of H_2O_2 in the pulmonary parenchyma of both exercised and thyroid hormones treated groups can be explained by the greater number of macrophages in this tissue. This can occur because thyroid hormones act by stimulating the oxygen consumption of mononuclear cells [34]. Likewise, exercise training increases enzymatic and phagocytic activities of macrophages [35]. In this regard, both interventions were able to partially reestablish the macrophages number and inflammatory infiltrate, also offering more protection against pathogens, since these cells are involved in immune defense and resistance against respiratory infections [36].

On the other hand, thyroid hormones treatment has different effects on the skeletal muscle. None of the interventions altered H_2O_2 levels in the gastrocnemius muscle, but only thyroid hormones treatment increased gastrocnemius sulfhydryl components. This result indicates that thyroid hormones have an additional effect on

the antioxidant protection of the skeletal muscle. Moreover, the increased concentration of sulfhydryl compounds can be essential for the more extended hypertrophy found in thyroid hormones treated group. The balance between nitrosylation and denitrosylation of sulfhydryl compounds modulates myoblasts proliferation, therefore playing an essential role on myoblasts proliferation and differentiation. The increase in addition of nitroso groups to sulfhydryl compounds induces myoblasts proliferation, whereas removal of nitroso groups from sulfhydryl compounds controls the proliferation [37]. Besides, sulfhydryl compounds are also essential for skeletal muscle contraction. Both nitrosylation and sulfhydryl oxidation can quickly induce calcium release from sarcoplasmic reticulum by regulation of RyR1, therefore controlling muscle performance [38,39].

In addition, the histological analysis revealed that the gastrocnemius hypertrophy was more extensive in thyroid hormones (83% of cases) than in exercise training group (43% of cases). The hypertrophy in skeletal muscle can be correlated with the exercise performance provided by both interventions.

As summarized in figure 7, although thyroid hormones treatment has provided additional benefits in some organs, the effects of both interventions on the heart and remote organs promoted a similar outcome in terms of exercise performance. This could indicate thyroid hormones treatment as a possible approach to enhance the daily tasks capacity and improve the quality of life after myocardial infarction, but only in cases where exercise training is not a safe alternative.

Additionally, this study has not investigated the effects of thyroid hormones treatment in the set of heart failure, therefore further researches are necessary to verify if this treatment could safely be used in these cases.

Acknowledgements: We would like to thank Alexandre Hickmann and Tânia Regina Gattelli Fernandes-Piedras for technical support, and Dr. André Ricardo Ribeiro Belló and Dr. Marcele Bandinelli for veterinary medical support.

Funding: This work was supported by the National Council for scientific and technological development [grant number 142025/2015-1].

Conflicts of interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Mourouzis I, Giagourta I, Galanopoulos G, Mantzouratou P, Kostakou E, Kokkinos AD, et al. Thyroid hormone improves the mechanical performance of the post-infarcted diabetic myocardium: A response associated with up-regulation of Akt/mTOR and AMPK activation. *Metabolism* 2013;62:1387–93. doi:10.1016/j.metabol.2013.05.008.
- [2] Pantos C, Mourouzis I, Markakis K, Dimopoulos A, Xinaris C, Kokkinos AD, et al. Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats. *Eur J Cardio-Thoracic Surg* 2007;32:333–9. doi:10.1016/j.ejcts.2007.05.004.
- [3] de Castro AL, Fernandes RO, Ortiz VD, Campos C, Bonetto JHP, Fernandes TRG, et al. Thyroid hormones improve cardiac function and decrease expression of pro-apoptotic proteins in the heart of rats 14 days after infarction. *Apoptosis* 2016;21:184–94. doi:10.1007/s10495-015-1204-3.
- [4] Rajagopalan V, Zhang Y, Ojamaa K, Chen Y, Pingitore A, Pol CJ, et al. Safe Oral Triiodo-L-Thyronine Therapy Protects from Post-Infarct Cardiac Dysfunction and Arrhythmias without Cardiovascular Adverse Effects. *PLoS One* 2016;11:e0151413. doi:10.1371/journal.pone.0151413.
- [5] Rajagopalan V, Zhang Y, Pol C, Costello C, Seitter S, Lehto A, et al. Modified Low-Dose Triiodo-L-thyronine Therapy Safely Improves Function Following Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Front Physiol* 2017;8:225. doi:10.3389/fphys.2017.00225.
- [6] Teixeira RB, Zimmer A, de Castro AL, de Lima-Seolin BG, Türck P, Siqueira R, et al. Long-term T3 and T4 treatment as an alternative to aerobic exercise training in improving cardiac function post-myocardial infarction. *Biomed Pharmacother* 2017;95:965–73. doi:10.1016/j.biopha.2017.09.021.
- [7] Teixeira RB, Zimmer A, de Castro AL, Carraro CC, Casali KR, Dias IGM, et al. Exercise training versus T3 and T4 hormones treatment: The differential benefits of thyroid hormones on the parasympathetic drive of infarcted rats. *Life Sci* 2018;196:93–101. doi:10.1016/j.lfs.2018.01.018.
- [8] Johns TNP, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of

- coronary occlusion in small animals. *Ann Surg* 1954;140:675–82.
- [9] Rodrigues B, Figueroa DM, Mostarda CT, Heeren M V, Irigoyen M-C, De Angelis K. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol* 2007;6:38. doi:10.1186/1475-2840-6-38.
- [10] Batista ML, Rosa JC, Lopes RD, Lira FS, Martins E, Yamashita AS, et al. Exercise training changes IL-10/TNF- α ratio in the skeletal muscle of post-MI rats. *Cytokine* 2010;49. doi:10.1016/j.cyto.2009.10.007.
- [11] Batista ML, Santos RVT, Oliveira EM, Seelaender MCL, Costa Rosa LFBP. Endurance training restores peritoneal macrophage function in post-MI congestive heart failure rats. *J Appl Physiol* 2007;102:2033–9. doi:10.1152/japplphysiol.00871.2006.
- [12] Xu X, Wan W, Ji L, Lao S, Powers AS, Zhao W, et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodelling in rats. *Cardiovasc Res* 2008;78:523–32. doi:10.1093/cvr/cvn028.
- [13] Nozawa E, Kanashiro RM, Murad N, Carvalho ACC, Cravo SLD, Campos O, et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* 2006;39:687–95. doi:/S0100-879X2006000500016.
- [14] Peron APON, Saraiva RM, Antonio EL, Tucci PJF. A função mecânica do miocárdio remanescente a um infarto do miocárdio é normal durante o período de cicatrização, embora exista insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol* 2006;86:105–12. doi:10.1590/S0066-782X2006000200005.
- [15] Tavares AMV, da Rosa Araújo AS, Baldo G, Matte U, Khaper N, Belló-Klein A, et al. Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. *Life Sci* 2010;87:699–706. doi:10.1016/j.lfs.2010.10.008.
- [16] Casali AG, Casali KR. The SiSyPhus Project: BioMedical Data Analysis Package 2007.
- [17] Pagani M, Malfatto G, Pierini S, Casati R, Masu AM, Poli M, et al. Spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy. *J Auton Nerv Syst* 1988;23:143–53.

- [18] Malliani A, Pagani M, Lombardi F, Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 1991;84:482–92.
- [19] Hu LW, Benvenuti LA, Liberti EA, Carneiro-Ramos MS, Barreto-Chaves MLM. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:R1473–80.
doi:10.1152/ajpregu.00269.2003.
- [20] Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol* 1982;243:H941-7.
- [21] Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980;38:161–70.
- [22] Ellman GL. Tissue Sufhydryl Groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70–7.
- [23] Hu M-L, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* 1993;121:257–62.
doi:10.5555/URI:PII:002221439390154Q.
- [24] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [25] Van Handel E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Anal Biochem* 1965;11:256–65. doi:10.1016/0003-2697(65)90013-8.
- [26] Lillie R, Fullmer H. *Histologic Technic and Pratical Histochemistry*. 4^o ed. New York: McGraw-Hill; 1976.
- [27] Luna L. Methods for reprocessing dried tissue specimens. *Histologic* 1978;8:1.
- [28] Sheehan DC, Hrapchak BB. *Theory and practice of histotechnology*. Ohio: Battelle Press; 1980.
- [29] Corssac GB, De Castro AL, Tavares A V., Campos C, Fernandes RO, Ortiz VD, et al. Thyroid hormones effects on oxidative stress and cardiac remodeling in the right ventricle of infarcted rats. *Life Sci* 2016;146:109–16.
doi:10.1016/j.lfs.2015.12.052.
- [30] Adamopoulos S, Gouziouta A, Mantzouratou P, Laoutaris ID, Dritsas A, Cokkinos D V., et al. Thyroid hormone signalling is altered in response to physical training in patients with end-stage heart failure and mechanical assist

- devices: Potential physiological consequences? *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2013;17:664–8. doi:10.1093/icvts/ivt294.
- [31] Hackney AC, Kallman A, Hosick KP, Rubin DA, Battaglini CL. Thyroid hormonal responses to intensive interval versus steady-state endurance exercise sessions. *Hormones* 2012;11:54–60.
- [32] Peixoto TCA, Begot I, Bolzan DW, Machado L, Reis MS, Papa V, et al. Early Exercise-Based Rehabilitation Improves Health-Related Quality of Life and Functional Capacity After Acute Myocardial Infarction: A Randomized Controlled Trial. *Can J Cardiol* 2015;31:308–13. doi:10.1016/j.cjca.2014.11.014.
- [33] Gary RA, Hodgson N, Cress ME, Higgins MK, Smith AL, Dunbar SB, et al. A Combined Aerobic and Resistance Exercise Program Improves Physical Functional Performance in Patients With Heart Failure: A Pilot Study. *J Cardiovasc Nurs* 2012;27:418–30. doi:10.1097/JCN.0b013e31822ad3c3.
- [34] Kvetny J, Matzen LE. Thyroid hormone induced oxygen consumption and glucose-uptake in human mononuclear cells. *Thyroidology* 1989;1:5–9.
- [35] Fehr HG, Lötzerich H, Michna H. Human macrophage function and physical exercise: phagocytic and histochemical studies. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1989;58:613–7.
- [36] Murphy EA, Davis JM, Brown AS, Carmichael MD, Van Rooijen N, Ghaffar A, et al. Role of lung macrophages on susceptibility to respiratory infection following short-term moderate exercise training. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 2004;287:R1354–8. doi:10.1152/ajpregu.00274.2004.
- [37] Yamashita AMS, Ancillotti MTC, Rangel LP, Fontenele M, Figueiredo-freitas C, Possidonio AC, et al. Regulation of Cell Signaling Pathways Balance between S -nitrosylation and denitrosylation modulates myoblast proliferation independently of soluble guanylyl cyclase activation 2018. doi:10.1152/ajpcell.00140.2016.
- [38] Sun Q, Hess DT, Nogueira L, Yong S, Bowles DE, Eu J, et al. Oxygen-coupled redox regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel by NADPH oxidase 4 2011. doi:10.1073/pnas.1109546108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1109546108.
- [39] Trimm JL, Salamas G, Abramson JJ. Sulfhydryl Oxidation Induces Rapid

Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum Vesicles * 1986:16092–8.

Tables

Table 1. Echocardiographic analysis 48 hours (baseline) and 74 days (endpoint) after MI

Parameter	Groups			
	SHAM	MI	MIE	MIH
Diastolic transverse area (LVDA) (cm²)				
Baseline	0.35±0.03	0.44±0.07 ^a	0.47±0.06 ^a	0.41±0.06
Endpoint	0.46 (0.45;0.50)	0.90 (0.85;1.02) ^a	0.78 (0.68;0.88) ^a	0.73 (0.60;0.84)
Systolic output (SO) (ml)				
Baseline	0.17 (0.14; 0.18)	0.11 (0.09; 0.16) ^a	0.12 (0.10;0.16)	0.14 (0.12;0.16)
Endpoint	0.31±0.04	0.35±0.05	0.31±0.05	0.33±0.06
Systolic parasternal length				
Baseline	0.55±0.08	0.66±0.08 ^a	0.71±0.05 ^a	0.64±0.08
Endpoint	0.62±0.06	0.91±0.18 ^a	0.88±0.07 ^a	0.77±0.11
Diastolic parasternal length				
Baseline	0.74±0.07	0.76±0.08	0.82±0.04	0.80±0.07
Endpoint	0.94±0.11	1.11±0.14 ^a	1.07±0.09	1.01±0.10
End-diastolic Wall stress index (LVEDWS index)				
Endpoint	2.44±0.22	3.61±0.50 ^a	2.82±0.30 ^b	2.78±0.16 ^b

Results are expressed as mean ± SD or median and interquartile range (25;75), as appropriate. Statistical analysis by One-way ANOVA and Tukey's post hoc or Kruskal-Wallis and pairwise comparisons. n=8/group. Groups: SHAM= SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE= Myocardial Infarction subjected to exercise training; MIH= Myocardial infarction supplemented with T3 and T4 hormones. ^a P<0,05 as compared to SHAM.

Table 2. Analysis of heart rate variability

Parameter	Groups			
	SHAM	AMI	AMI+E	AMI+H
HRV (ms ²)	19.02 (11.89; 34.17)	31.99 (6.89; 46.58)	19.90 (11.54; 31.01)	6.40 (4.24; 13.96)
HRV-fLF (Hz)	0.47±0.07	0.49±0.08	0.51±0.11	0.59±0.15
HRV-fHF (Hz)	1299.50 ± 90.58	1321.14±169.70	1353.50 ±144.55	1550.20 ± 271.01
LF [abs] (ms ²)	2.03 (0.78; 4.05)	3.29 (1.53; 14.62)	3.03 (1.58; 9.91)	1.98 (0.32; 2.75)
HF [abs] (ms ²)	11.87 (7.84; 27.28)	25.62 (3.84; 28.68)	9.53 (4.54; 15.80)	4.14 (3.22; 7.62)
LF/HF index	0.16 (0.06; 0.32)	0.37 (0.14; 0.44)	0.33 (0.14; 1.21)	0.30 (0.08; 0.54)
SAPV (mmHg ²)	1.46 (1.02; 3.65)	1.97 (1.48; 2.06)	1.82 (1.27; 2.61)	4.56 (2.28; 5.25)
VLF-SAPV (mmHg ²)	0.29 (0.16; 1.73)	0.12 (0.08; 0.16)	0.16 (0.09; 0.24)	0.17 (0.15; 0.83)

Results are expressed as mean ± SD or median and interquartile range (25;75), as appropriate. Statistical analysis by One-way ANOVA and Tukey's post hoc or Kruskal-Wallis and pairwise comparisons. n=5-8/group.

HRV= heart rate variability; HRV-fLF= central frequency of the LF component of heart rate variability ; LF [abs]= absolute powers of low frequency; HRV-fHF= central frequency of the HF component of heart rate variability ; HF [abs]= absolute powers of high frequency; LF/HF = ratio between low frequency and high frequency powers; SAPV= systolic arterial pressure variability; and VLF-SAPV= very low frequency component of the systolic arterial pressure variability. Groups: SHAM= SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE= Myocardial Infarction subjected to exercise training; MIH= Myocardial infarction supplemented with T3 and T4 hormones.

Table 3. Morphometric analysis and hypertrophy indices

Measurement	Groups			
	SHAM	MI	MIE	MIH
LV				
LV weight (no scar)	--	0.54±0.06	0.46±0.06	0.57±0.06
Scar weight	--	0.35 (0.31;0.43)	0.45 (0.32;0.46)	0.34 (0.31;0.47)
LV/Heart weight (g/g)	0.79±0.01	0.75±0.08	0.79±0.01	0.79±0.03
RV				
RV weight (g)	0.21±0.02	0.31±0.12	0.23±0.03	0.26±0.05
RV/ heart weight (g/g)	0.21±0.01	0.25±0.08	0.21±0.01	0.21±0.03
RV/LV weight ratio	0.27±0.02	0.35±0.15	0.26±0.02	0.27±0.05
RV/Body weight (mg/g)	0.46±0.04	0.71±0.30	0.53±0.05	0.61±0.12
RV/Tibial length (mg/cm)	5.31±0.60	7.89±2.96	5.79±0.66	6.66±1.37
Lung				
Lung weight (g)	1.08 (1.03;1.15)	1.13 (1.05;2.46)	1.04 (0.95;1.15)	1.06 (1.01;1.16)
Lung/Body weight(mg/g)	2.43 (2.31;2.53)	2.60(2.20;5.89)	2.45(2.34;2.66)	2.58 (2.32;2.66)
Lung/Tibial length (mg/cm)	28.04 (26.73;29.05)	28.84 (26.94;63.38)	27.06 (24.43;29.23)	27.45 (26.34;29.56)
Gastrocnemius				
Gastrocnemius weight (g)	2.58 (2.54;2.65)	2.50 (2.41;2.65)	2.37 (2.26;2.59)	2.31 (2.18;2.59)
Gastrocnemius/Body weight (mg/g)	5.82±0.18	5.69±0.32	5.71±0.29	5.48±0.29
Gastrocnemius/Tibial length (mg/cm)	66.66±1.97	64.25±3.45	62.42±3.92	59.88±4.65 ^a

Results are expressed as mean ± SD or median and interquartile range (25;75), as appropriate. Statistical analysis by One-way ANOVA and Tukey's post hoc or Kruskal-Wallis and pairwise comparisons. n=6-8/group. Groups: SHAM= SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE= Myocardial Infarction subjected to exercise training; MIH= Myocardial infarction supplemented with T3 and T4 hormones. LV= left ventricle; RV= right ventricle. ^a P<0,05 as compared to SHAM.

Table 4. Lung and gastrocnemius histology

Parameter	Groups			
	SHAM	MI	MIE	MIH
Lung				
<i>Macrophages</i>				
Low	57.14	85.71	57.14	33.33
Moderate	42.86	0	42.86	66.67
Accentuated	0	14.29	0	0
<i>Inflammatory infiltrate</i>				
Low	71.43	42.86	28.57	50
Moderate	28.57	42.86	71.43	50
Accentuated	0	14.28	0	0
Gastrocnemius				
<i>Hypertrophy</i>				
Absent	100	100	57.14	16.67
Low	0	0	42.86	66.66
Moderate	0	0	0	0
Accentuated	0	0	0	16.67

Results are showed as percentage (%) of the total in each group and classified as absent, low, moderate or accentuated. n=6-7/group. Groups: SHAM= SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE= Myocardial Infarction subjected to exercise training; MIH= Myocardial infarction supplemented with T3 and T4 hormones.

Figures

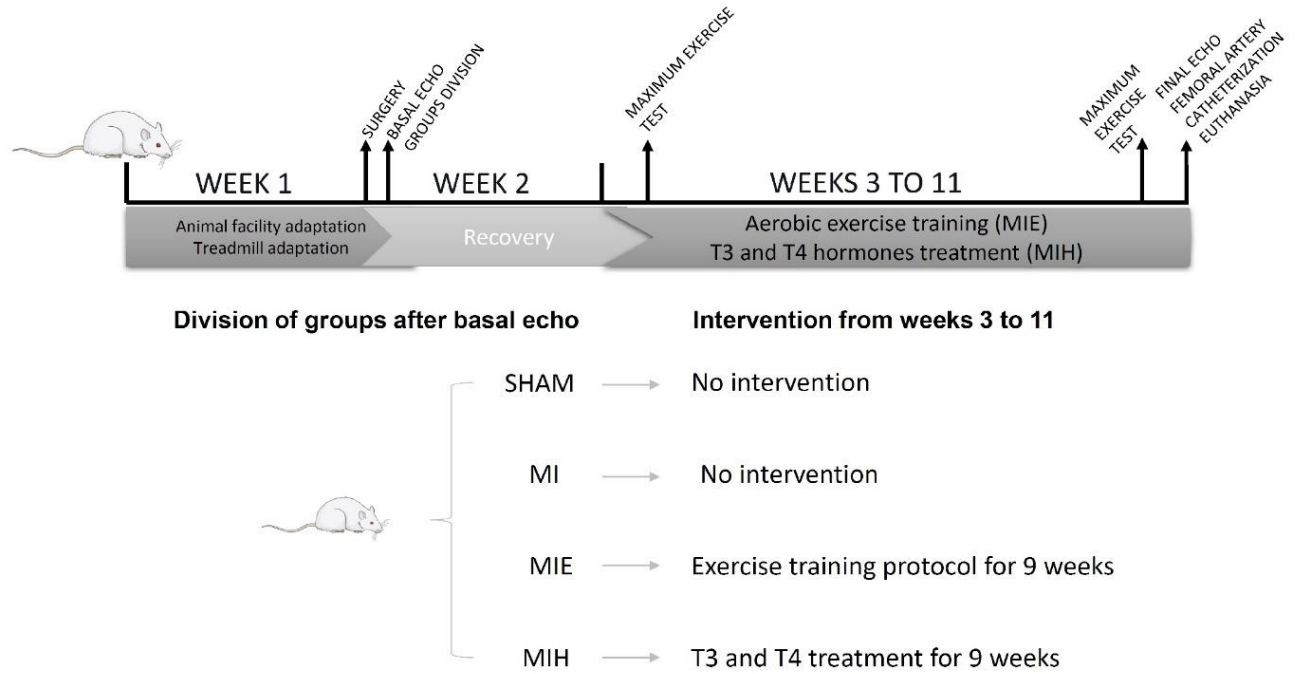


Figure 1. Experimental protocol illustration.

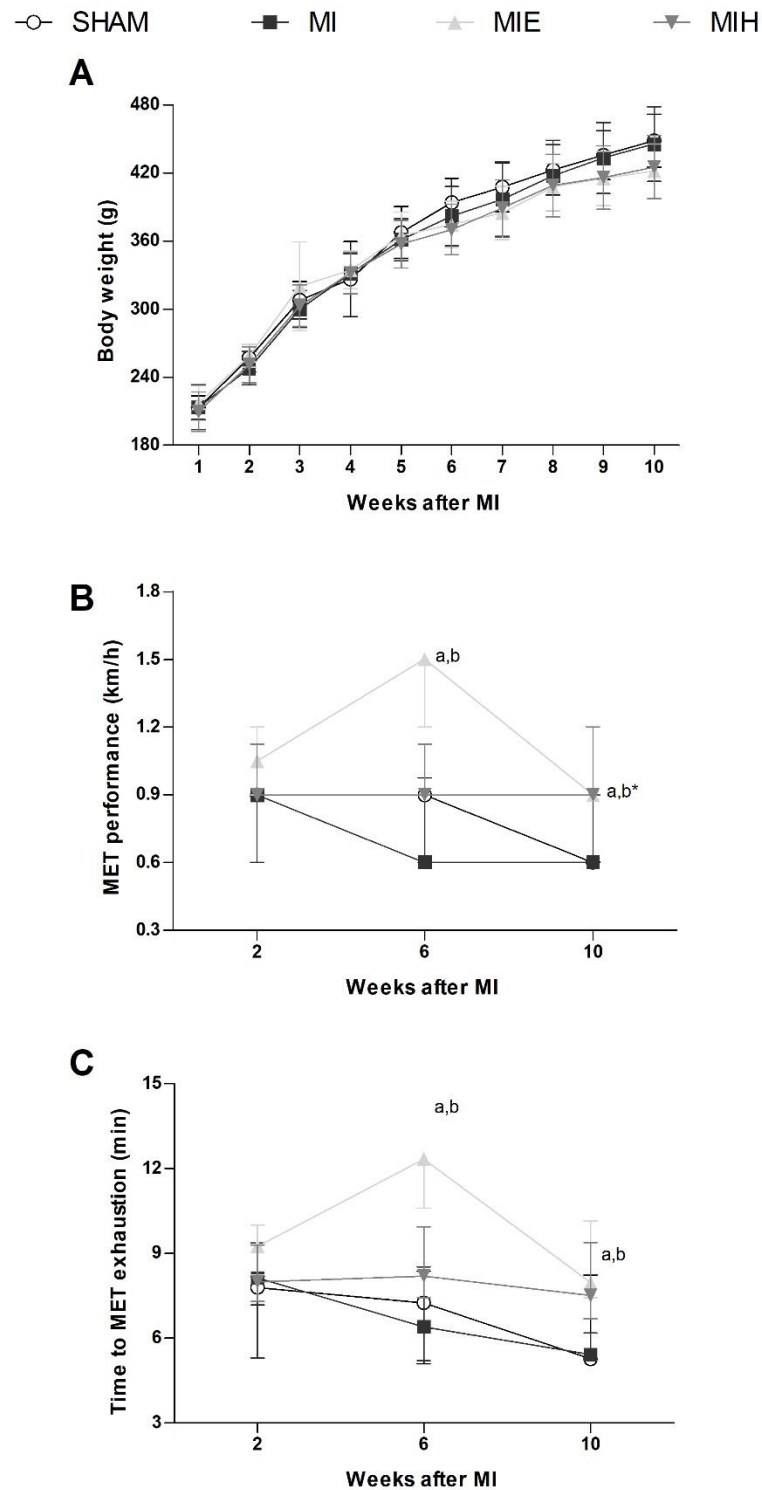


Figure 2. Values of body weight (A), MET performance (B), and time until animal exhaustion in the MET (C) overtime. Results are expressed as mean \pm SD (A) or median and interquartile (25;75 - B, C), as appropriate. Statistical analysis by repeated measures ANOVA or Kruskal-Wallis and pairwise comparisons. $n=6-8/\text{group}$. MET: Maximum exercise test. Groups: SHAM= SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE= Myocardial Infarction subjected to exercise training; MIH= Myocardial infarction supplemented with T3 and T4 hormones. ^a $P<0,05$ as compared to SHAM. ^b $P<0,05$ as compared to MI. * Both exercise training and thyroid hormones treatment.

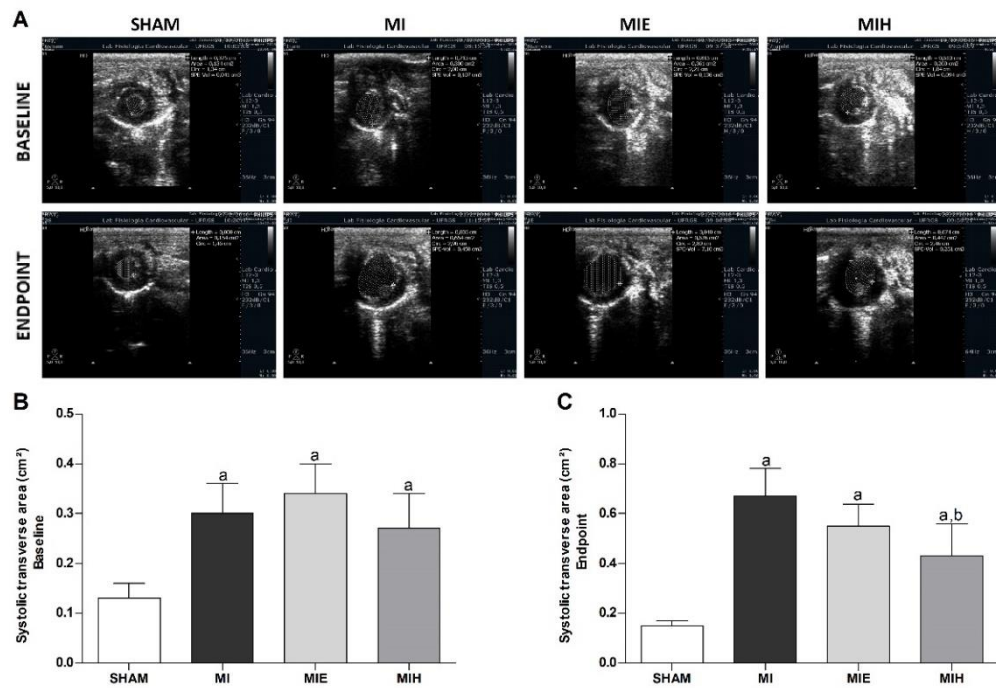


Figure 3. Evaluation of systolic transverse area by echocardiography. Representative images of the systolic transverse area at baseline and endpoint analysis (A). Values of baseline (B) and endpoint (C) echocardiographic assessment. Results are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis by One-way ANOVA and Tukey's post-hoc. $n=8/\text{group}$. Groups: SHAM= SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE= Myocardial Infarction subjected to exercise training; MIH= Myocardial infarction treated with T3 and T4 hormones. ^a $P<0,05$ as compared to SHAM. ^b $P<0,05$ as compared to MI.

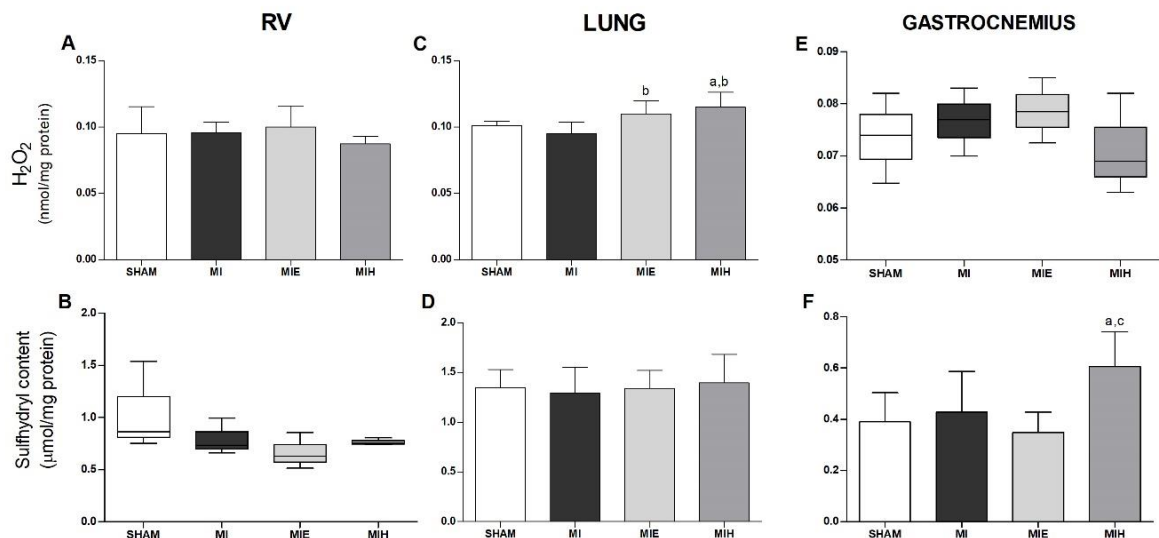


Figure 4. Results of oxidative stress analysis. Values of H₂O₂ and Sulfhydryl content in the RV (A and B), lung (C and D), and gastrocnemius (E and F). Results are expressed as mean \pm SD or median and interquartile range (25;75), as appropriate. Statistical analysis by One-way ANOVA and Tukey's post hoc or Kruskal-Wallis and pairwise comparisons. $n=6-7/\text{group}$. Groups: SHAM= SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE= Myocardial Infarction subjected to exercise training; MIH= Myocardial infarction supplemented with T3 and T4 hormones. ^a $P<0,05$ as compared to SHAM. ^b $P<0,05$ as compared to MI. ^c $P<0,05$ as compared to MIE.

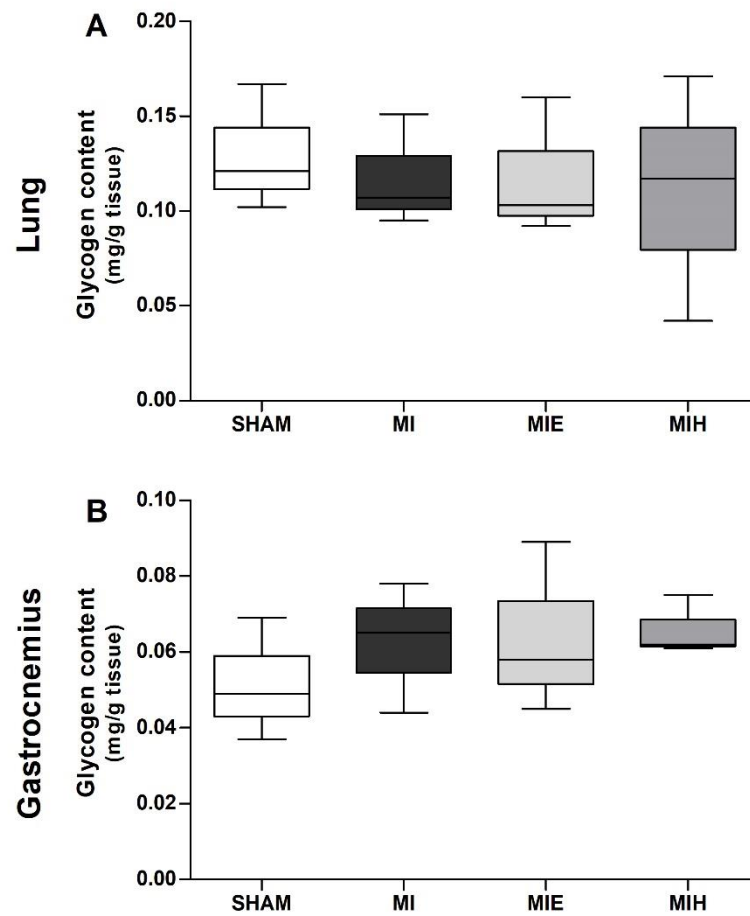


Figure 5. Results of Glycogen content analysis in the lung (A) and gastrocnemius (B). Results are expressed as median and interquartile range (25;75). Statistical analysis by Kruskal-Wallis and pairwise comparisons. $n=7/\text{group}$. Groups: SHAM= SHAM operated; MI = Myocardial Infarction; MIE= Myocardial Infarction subjected to exercise training; MIH= Myocardial infarction supplemented with T3 and T4 hormones.

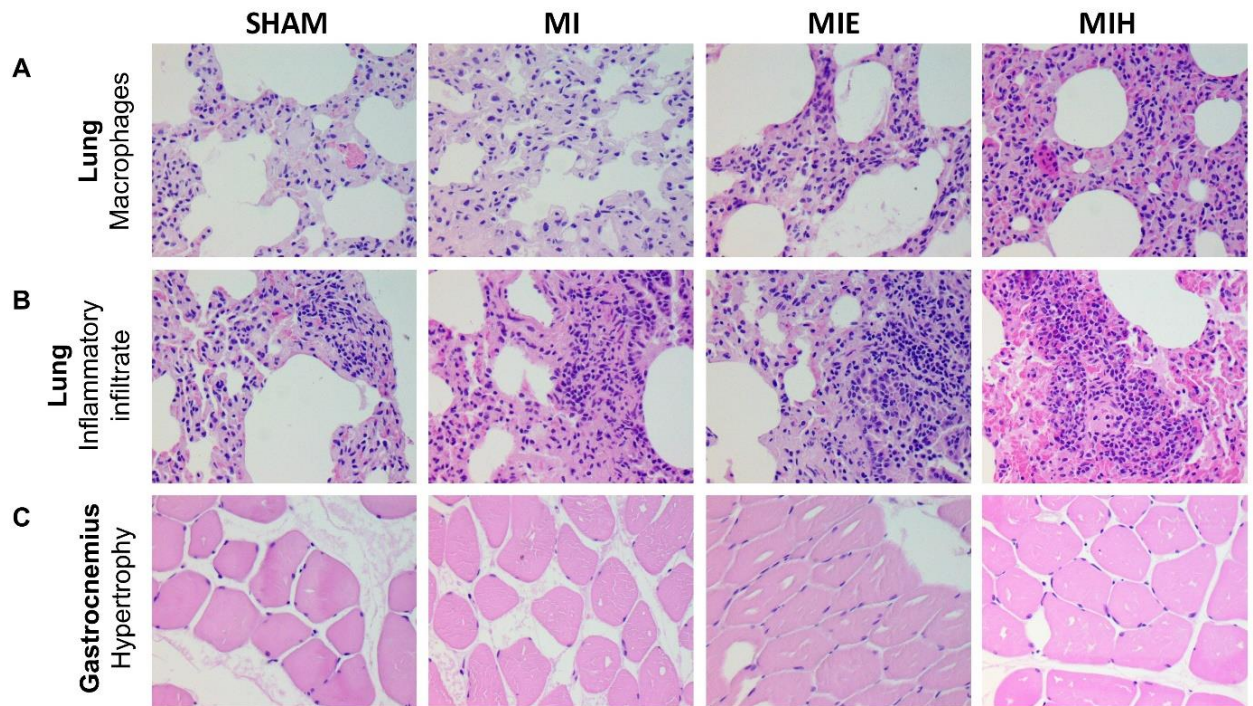


Figure 6. Representative images of histological analysis. 400x magnified images of macrophages presence (A) and inflammatory infiltrate (B) analysis in the lung, and from hypertrophy analysis in the gastrocnemius muscle (C).

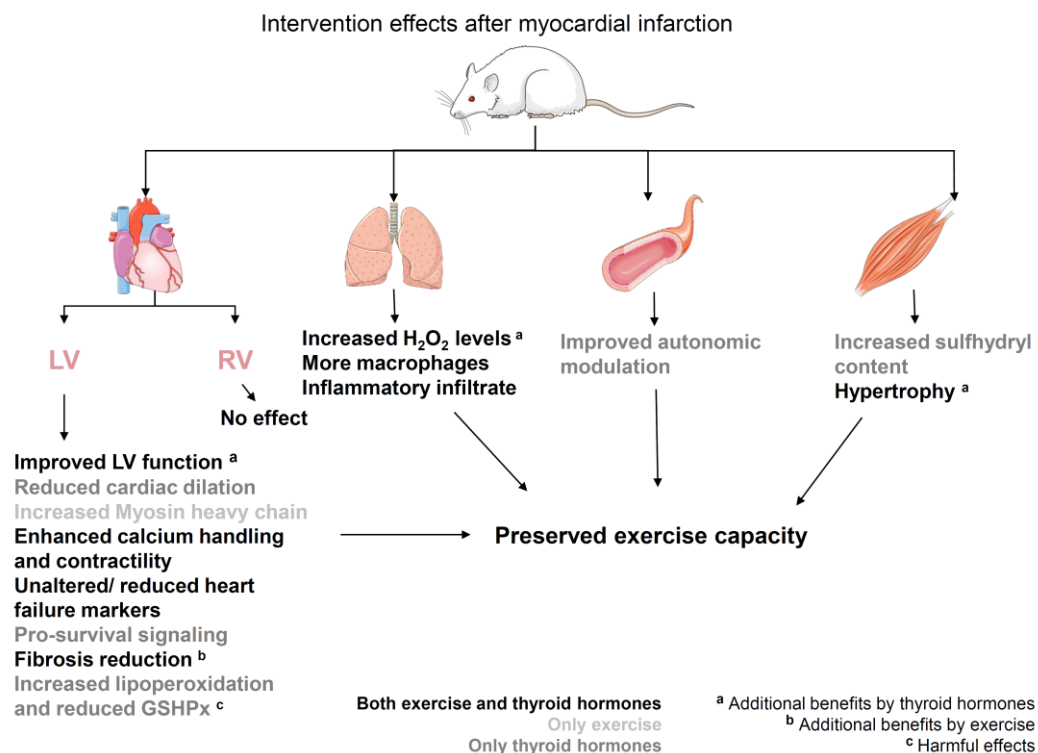


Figure 7. Suggested effects promoted by the interventions on the different organs and its interaction. Results written in black font represent similar effects by both interventions. Strong gray font represents effects promoted only by T3 and T4 treatment. Weak gray font represents effects promoted only by exercise training. ^a additional benefits by T3 and T4 treatment. ^b exercise training had additional benefits. ^c harmful effect.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo consistiu em uma comparação dos efeitos do tratamento com hormônios T3 e T4 em relação àqueles determinados pelo treinamento físico em modelo experimental de infarto agudo do miocárdio induzido cirurgicamente. O principal foco do estudo foi avaliar a função cardíaca, especificamente do VE. Todavia, como os hormônios da tireoide também exercem efeitos em diversos outros órgãos, foi importante investigar se a dose hormonal utilizada neste estudo tem efeitos em outros tecidos e se essa ação pode ser benéfica aos órgãos periféricos. Nesse sentido, foram avaliados também alguns parâmetros no parênquima pulmonar e no músculo gastrocnêmio. Priorizando a clareza da apresentação das informações obtidas na tese, a discussão foi elaborada em subitens, conforme os parâmetros e/ou o tecido avaliado.

7.1 Efeitos do tratamento com baixa dose de hormônios T3 e T4 sobre a função cardíaca são semelhantes aos proporcionados pelo treinamento físico

Diversas análises foram realizadas para verificar a função cardíaca dos ratos submetidos não somente ao tratamento com hormônios T3 e T4, mas também ao treinamento físico após o infarto. Os dados de ecocardiografia, a análise de contratilidade e das proteínas do manejo do cálcio trouxeram robustez e profundidade aos resultados, possibilitando desta forma propor alguns mecanismos fisiológicos relacionados a esse contexto experimental, conforme evidenciado pelo artigo 1. Os resultados de ecocardiografia iniciais demonstraram que os grupos infartados iniciaram os protocolos de intervenção ou sedentarismo tendo um nível de prejuízo similar na função cardíaca (Tabela 1 – artigos 1 e 2). Ao final dos protocolos, pôde-se evidenciar que o grupo IM apresentou piora na função cardíaca, enquanto que o grupo infartado treinado (IME), assim como o infartado que recebeu hormônios T3 e T4 (IMH), demonstraram um recuo parcial do declínio da função cardíaca (Tabela 1 – artigo 1 e Tabela 2 – artigo 2).

Um fato relevante foi que, quando comparado ao treinamento físico, o tratamento de baixa dose com hormônios da tireoide apresentou resultados similares, como melhora da pressão sistólica ventricular, aumento da espessura da parede posterior na diástole, redução da expressão de HSP70 e aumento da razão força-

frequência de estimulação no VE. Por outro lado, o tratamento com T3 e T4 promoveu alguns benefícios até mesmo mais expressivos quando comparado ao treinamento físico, como a redução da área de infarto, o aumento na fração de ejeção e da espessura da parede posterior durante a sístole, a redução do volume diastólico e menor dilatação do VE (artigos 1, 2 e 3). Contudo, estes resultados devem ser interpretados com cautela. Por exemplo, a hipertrofia mais intensificada no grupo tratado com T3 e T4 (Tabela 2 – artigo 1 e Tabela 4 – artigo 2) não necessariamente significa que os hormônios da tireoide sejam melhores que o treinamento físico para evitar o remodelamento patológico após o infarto, pois apenas a partir desse índice não é possível dizer se a hipertrofia mais intensa corresponde à hipertrofia fisiológica, ou à patológica. Outro exemplo é que, embora o tratamento com T3 e T4 tenha sido o único a promover a redução da área de infarto e prevenção da dilatação da câmara, os hormônios reduziram a fibrose do VE em menor intensidade quando comparados ao treinamento físico (Tabela 1 – artigo 1, Tabela 2 e Figura 4 – artigo 2).

Um dado importante foi que a dose combinada de T3 e T4 utilizada neste trabalho foi a primeira a não causar efeitos adversos, que são comuns quando do uso de altas doses de hormônios tireoidianos, como o aumento na frequência cardíaca e nos níveis séricos de T3 e T4 (Tabela 1 e Figura 2 – artigo 1) (CHEN et al., 2013; MOUROUZIS et al., 2013; PANTOS et al., 2009). Este resultado corrobora outros dados prévios, demonstrando que o uso de baixa dose não somente de T3, mas também da combinação de T3 e T4, é mais seguro e minimiza os efeitos adversos que contribuem para o remodelamento patológico (RAJAGOPALAN et al., 2016). Neste sentido, conforme foi avaliado por cateterismo do VE (Figura 1 – artigo 1) e por análise de expressão da SERCA e PLB por Western blot (Figuras 3 e 4 – artigo 1), o tratamento com baixa dosagem de T3 e T4 aumenta a relação força-frequência de estimulação, aumentando a capacidade de resposta contrátil do miocárdio frente ao estímulo do sistema autonômico. Neste caso, há mais cálcio disponível no mioplasma para que haja uma resposta rápida. Além disso, de forma similar ao treinamento físico, o tratamento com baixas doses de hormônios T3 e T4, diferente dos tratamentos de alta dosagem, reduziu a expressão de HSP70, cujo aumento está relacionado ao pior prognóstico, progressão para insuficiência cardíaca e morte (JENEI et al., 2013; PANTOS et al., 2008). Esse resultado, associado a hipertrofia, ao aumento na fração de ejeção, à redução da área de infarto e da deposição de tecido fibroso, sem

alterações na frequência cardíaca ou níveis hormonais, pode significar uma grande proteção à função cardíaca proporcionada pelo tratamento com os hormônios T3 e T4 (artigos 1 e 2).

Ainda neste sentido, um achado importante deste estudo foi o aumento da expressão proteica da t-Akt no grupo tratado com hormônios T3 e T4 quando comparado ao grupo SHAM. O aumento de t-Akt está associado ao remodelamento cardíaco fisiológico, onde há hipertrofia aliada à função sistólica preservada do VE (MATSUI et al., 2002; MOUROUZIS et al., 2013). Ainda, como previamente descrito, a inativação da via PI3K/Akt/Gsk3 β /EROs pela ET-1 induz a hiperinervação simpática do SNCl, estimulando o remodelamento patológico do VE (LEE; CHANG; LIN, 2017). Desta forma, o aumento da t-Akt apenas no grupo MIH pode representar que o tratamento com T3 e T4 tenha efeitos adicionais na proteção contra o remodelamento patológico após o infarto, quando comparado ao treinamento físico. Contudo, mais estudos seriam necessários neste aspecto antes que se possa fazer tal afirmação.

7.2 O tratamento com hormônios T3 e T4 proporciona efeitos benéficos à função vascular.

Aliado à resposta do coração à estímulos autonômicos, foi também observado, por meio do cateterismo da artéria femoral realizado neste estudo, que os animais que receberam hormônios da tireoide tiveram maior variabilidade da pressão arterial sistólica no componente de alta frequência (HF-SAPV), o que significa maior capacidade de resposta vascular à modulação autonômica (Tabela 3 – artigo 2). Embora não tenhamos investigado, é provável que haja vasodilatação periférica em resposta a estimulação nitrérgica aumentada, uma vez que os hormônios da tireoide podem promover o relaxamento do músculo liso vascular, efeito este que pode ser acompanhado pelo aumento de NO (COLANTUONI et al., 2004; MAKINO et al., 2012; TODA; OKAMURA, 2015). Este seria um efeito benéfico, pois traz melhora na perfusão tecidual. Porém, este benefício foi encontrado apenas nos animais tratados com os hormônios T3 e T4, sendo um efeito diferencial deste tratamento quando comparado ao treinamento físico.

7.3 O uso combinado de T3 e T4 altera o estado redox do VE, mas não promove alterações no VD

Ao analisarmos o estado redox do VE, encontramos resultados contrários aos resultados de função cardíaca. Diferente do que ocorreu com o grupo submetido a treinamento físico, os animais do grupo que recebeu hormônios tireoidianos apresentaram níveis aumentados de TBARS em comparação a todos os demais grupos, o que pode significar que este tratamento no longo prazo induz aumento da lipoperoxidação (Figura 5C – artigo 2). Os animais do grupo IMH também tiveram redução da atividade da SOD quando comparados ao grupo IME, embora não diferente dos grupos SHAM e IM; além de redução na atividade da GSHPx quando comparados ao grupo IM (Figura 6A e C – artigo 2). Estes resultados podem indicar que o tratamento de 9 semanas com a dosagem utilizada neste estudo ainda não é o mais adequado, e que tratamentos com essa dose por períodos maiores provavelmente trariam malefícios ao estado redox e a função cardíaca. Com relação ao VD, não foram encontradas alterações em ambas as intervenções realizadas após o infarto. Embora sejam necessários mais estudos, este resultado pode significar que, diferente do encontrado quando se utiliza alta dose de hormônios T3 e T4 por um período curto de tempo, o uso de dosagem mais baixa de T3 e T4, mesmo que por períodos mais longos, pode não influenciar ou causar efeitos não tão significativos sobre a função do VD (CORSSAC et al., 2016).

7.4 O tratamento com T3 e T4 influencia a performance física após o infarto

Por outro lado, aliado à melhora significativa na função cardíaca e vascular, os animais do grupo que recebeu a dose combinada de hormônio T3 e T4 apresentaram desempenho físico similar aos do grupo treinado (Figura 2B – artigo 3) no teste de esforço máximo final em esteira. Este foi o primeiro estudo a demonstrar que a baixa dose de T3 e T4, assim como o treinamento físico, é capaz de melhorar a performance física, e, portanto, no mínimo retardar o avanço do remodelamento patológico. É provável que a dose utilizada neste estudo seja capaz de mimetizar a sinalização induzida pelo treinamento físico, uma vez que grande parte dos efeitos benéficos proporcionados pelo treinamento físico após o infarto ocorrem devido à sua ação

sobre os hormônios tireoidianos (ADAMOPOULOS et al., 2013; HACKNEY et al., 2012b). Embora o próprio treinamento físico venha sendo estudado como forma de induzir a tolerância ao exercício, este resultado pode significar uma alternativa para melhorar a capacidade física, apenas nos casos em que os pacientes infartados desenvolvem intolerância ao exercício e o mesmo não é capaz de revertê-la (BANKS et al., 2016; FLEG et al., 2015; LEE et al., 2014).

7.5 Ambos treinamento físico e tratamento com T3 e T4 induzem alterações no estado redox e melhoram a resposta imune pulmonar

Com a melhora da função cardíaca, juntamente ao aumento da performance física, também era de se esperar benefícios no tecido pulmonar. Ao avaliarmos o conteúdo de H_2O_2 no parênquima pulmonar, encontramos níveis aumentados tanto no grupo treinado quanto no grupo que recebeu o tratamento com T3 e T4, quando comparados ao grupo infartado que não recebeu intervenção terapêutica (Figura 4C – artigo 3). O nível de H_2O_2 foi também aumentado em comparação ao grupo SHAM, devido ao tratamento com hormônios tireoidianos. Essa alteração não foi acompanhada por amplificação da resposta antioxidante, medida por meio dos níveis de sulfidrilas, e provavelmente ocorreu devido à maior demanda de oxigênio, que é estimulada por ambas as intervenções.

A alta demanda de oxigênio pode ser explicada pela maior presença de células de defesa imunológica no pulmão, tanto no grupo treinado quanto no que recebeu hormônios tireoidianos (Tabela 4 e Figura 6 – artigo 3). Isso porque os hormônios tireoidianos exercem efeito direto na fosforilação oxidativa, induzindo o aumento do consumo de oxigênio nas células mononucleares (KVETNY; MATZEN, 1989). De forma similar, o treinamento físico induz aumento na atividade enzimática e fagocítica de macrófagos (FEHR; LÖTZERICH; MICHNA, 1989). Neste sentido, a elevação dos níveis de H_2O_2 pode estar relacionada ao maior grau de presença de macrófagos e infiltrado inflamatório encontrado na análise histológica dos grupos IMH e IME, em comparação com o grupo IM. Ambas as intervenções foram capazes de restabelecer parcialmente o nível de macrófagos e infiltrado inflamatório, que foi alterado nos animais do grupo IM.

Conforme previamente descrito na literatura, os macrófagos pulmonares desempenham um papel muito importante na resistência a infecções respiratórias; e apenas uma semana de exercício moderado em esteira é capaz de aumentar a resistência viral dos macrófagos, reduzindo assim a morbidade e mortalidade devido à infecção respiratória (MURPHY et al., 2004). Portanto, a recuperação do número de macrófagos no pulmão dos animais dos grupos IME e IMH é um efeito benéfico que pode ter papel essencial na defesa imunológica após o infarto.

7.6 O tratamento com hormônios tireoidianos induz aumento de defesas antioxidantes, hipertrofia e maior reserva contrátil do músculo gastrocnêmio

Diferente do VD e do pulmão, a análise do estado redox do gastrocnêmio demonstrou níveis de H_2O_2 inalterados entre os grupos, mas aumento dos níveis de sulfidrilas apenas no grupo que recebeu hormônios T3 e T4 (Figura 4F – artigo 3). Este resultado pode indicar um mecanismo de proteção antioxidante no músculo esquelético, que pode, juntamente com os benefícios na função cardiovascular, estar contribuindo para o melhor desempenho em esteira deste grupo quando comparado aos grupos que não tiveram intervenção.

Devido ao melhor desempenho físico em esteira, também se esperaria alterações benéficas no tecido muscular esquelético, tanto dos animais do grupo IME quanto do IMH. Ao avaliarmos os índices de hipertrofia do músculo gastrocnêmio, o mesmo apresentou um valor reduzido da razão entre o peso do gastrocnêmio e o comprimento da tíbia no grupo tratado com hormônios tireoidianos, apenas quando comparado ao grupo SHAM (Tabela 3 - artigo 3), não havendo diferenças entre os grupos infartados. Também não houve alteração no valor de peso do gastrocnêmio com relação ao peso corporal. No entanto, a análise histológica revelou a presença de hipertrofia em cerca de 43% dos animais do grupo IME. Já a hipertrofia encontrada no grupo IMH foi surpreendentemente mais abrangente, estando presente em 83% dos animais. Desta forma, ambos treinamento físico e tratamento com T3 e T4 induziram hipertrofia no músculo gastrocnêmio, o que certamente proporcionou o maior desempenho físico no teste de esforço em esteira.

O aumento de sulfidrilas pode ter tido um papel determinante para a hipertrofia mais intensa devido ao tratamento com hormônios T3 e T4. Isso porque as sulfidrilas,

também conhecidas como grupos tióis, têm um papel essencial na proliferação e diferenciação de mioblastos. O NO pode reagir com os grupos sulfidrilas livres, formando S-nitrosotióis por meio da adição de um grupo nitroso aos tióis, reação esta chamada de S-nitrosilação. Por meio desta reação, o NO pode controlar diversas vias de sinalização intracelular. Por outro lado, enzimas chamadas desnitrosilases podem remover o grupo nitroso dos tióis, reação essa chamada de desnitrosilação. O equilíbrio entre a S-nitrosilação e a desnitrosilação de grupos tióis modula a proliferação dos mioblastos, de forma que o aumento da nitrosilação induz a proliferação de mioblastos, enquanto a remoção do grupo nitroso dos tióis pela desnitrosilação pode regular o nível de sua proliferação (YAMASHITA et al., 2018).

Além de atuarem na proliferação muscular, as sulfidrilas são também essenciais para a contração do músculo esquelético, de forma que o aumento de sulfidrilas pode ser visto como uma reserva que proporciona melhor resposta contrátil durante o exercício. Isso porque tanto a nitrosilação quanto a oxidação de sulfidrilas induzem a rápida liberação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático no músculo esquelético por meio da regulação do RyR1, controlando assim a performance muscular (SUN et al., 2011; TRIMM; SALAMAS; ABRAMSONLL, 1986). Neste caso, o aumento dos níveis de sulfidrilas no gastrocnêmio dos animais do grupo IMH poderia colaborar para o aumento de cálcio no citoplasma celular e proporcionar boa capacidade contrátil durante o exercício, o que poderia explicar o bom desempenho do grupo IMH no teste de esforço máximo.

8 CONCLUSÃO

A figura 7 do artigo 3 ilustra os principais achados deste estudo. Juntando todos estes resultados, é possível observar que o tratamento com hormônios T3 e T4 se sobressaiu em alguns aspectos importantes, proporcionando menor dilatação cardíaca, melhor modulação autonômica vascular e melhor reserva contrátil ao músculo gastrocnêmio, decorrente do aumento de sulfidrilas; sendo que todos estes benefícios não foram proporcionados pelo treinamento físico. Entretanto, com relação à capacidade física, todos estes efeitos adicionais promovidos pelo tratamento com T3 e T4 não causaram melhora adicional no desempenho em esteira destes animais em comparação aos que realizaram treinamento físico.

Contudo, apenas o fato de que a melhora na capacidade física induzida pelo tratamento oral com hormônios T3 e T4 foi similar à proporcionada pelo treinamento físico já representa um achado inédito deste estudo. Outro achado que foi igualmente descrito pela primeira vez neste estudo foi o uso de baixas doses de hormônios T3 e T4 que não causaram efeitos adversos sobre os níveis de T3, T4 e TSH, ou sobre a frequência cardíaca.

Embora este estudo tenha trazido bons resultados, alguns deles, como por exemplo o aumento da lipoperoxidação, e a redução de GSHPx no VE dos animais que receberam hormônios T3 e T4 (figuras 5 e 6 - artigo 2), indicam que o uso de T3 e T4 na dose administrada neste estudo provavelmente não é seguro por períodos mais prolongados. Estudos que busquem resultados melhores, ou seja, com o mínimo de efeitos adversos devem incluir a redução na duração do tratamento e/ou na dosagem de T3 e T4 para valores menores que os utilizados neste estudo.

De qualquer forma, os resultados deste estudo reforçam que o tratamento com baixas doses de hormônios T3 e T4 tem potencial como uma alternativa terapêutica coadjuvante após o infarto, trazendo benefícios não só ao coração, mas também beneficiando órgãos remotos como o pulmão, vasculatura e o músculo esquelético, de forma similar ao que ocorre com o treinamento físico, de forma que todos estes benefícios nos diferentes órgãos contribuem de forma conjunta para a melhora da capacidade física. Embora mais estudos sejam necessários, inclusive estudos translacionais, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o tratamento com baixa dose de hormônios T3 e T4 pode ser uma alternativa em casos de intolerância ao exercício após o infarto.

9 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

Conforme mostrado neste estudo, há uma melhora substancial na função cardíaca dos animais que são tratados com hormônios T3 e T4 após o infarto. Descrevemos neste estudo a melhora da modulação autonômica vascular, e acreditamos que provavelmente os efeitos benéficos do tratamento com hormônios da tireoide sobre a função cardíaca sejam mediados de forma similar, protegendo contra o remodelamento do SNCI. Para testar esta hipótese, uma das perspectivas do estudo é verificar a expressão da via da ET-1/PI3K/Akt/Gsk3 β /ROS no VE, a qual é diretamente envolvida no processo de remodelamento mal adaptativo do SNCI.

Outra questão a explorar é quais vias de sinalização estão envolvidas na promoção de hipertrofia no músculo gastrocnêmio. Para isso, avaliaremos a expressão de proteínas de manejo do cálcio (SERCA, PLB e RyR1), e de proteínas relacionadas à estrutura e contração muscular (MYH 1/2/4/6/7 e α -actinina). Também avaliaremos o envolvimento do estresse oxidativo (atividade e expressão da NADPH oxidase, SOD, CAT, GSHPx) e se há indução de angiogênese (expressão proteica de VEGF e NOS) no pulmão e gastrocnêmio. Ainda, avaliaremos a atividade da citrato sintase nos músculos gastrocnêmio e sóleo, a qual é utilizada como marcador de efeito proporcionado pelo exercício e pode ser relacionada à performance obtida no TEM. Por fim, avaliaremos também a atividade e expressão da NOS na aorta para ter uma evidência mais clara com respeito ao aumento da modulação autonômica e o efeito sobre o relaxamento vascular que foi sugerido neste estudo.

10 REFERÊNCIAS

- ABBATE, A. et al. Right Ventricular Cardiomyocyte Apoptosis in Patients with Acute Myocardial Infarction of the left Ventricular Wall. **Am J Cardiol**, [s. l.], v. 102, n. 6, p. 658–662, 2008.
- ADAMOPOULOS, S. et al. Thyroid hormone signalling is altered in response to physical training in patients with end-stage heart failure and mechanical assist devices: Potential physiological consequences? **Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 664–668, 2013.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, [s. l.], v. 105, p. 121–6, 1984.
- AGO, T. et al. Pathophysiological Roles of NADPH Oxidase/Nox Family Proteins in the Vascular System. **Circulation Journal**, [s. l.], v. 75, n. 8, p. 1791–1800, 2011.
- ARDELL, J. L. et al. Activity of in vivo atrial and ventricular neurons in chronically decentralized canine hearts. **The American journal of physiology**, [s. l.], v. 260, n. 3 Pt 2, p. H713-21, 1991.
- ARDELL, J. L. Intrathoracic neuronal regulation of cardiac function. In: J, ed. A. J. & A. (Ed.). **Basic and Clinical Neurocardiology**. New York: Oxford, 2004. p. 187–219.
- ARMOUR, J. A. Myocardial ischaemia and the cardiac nervous system. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 41, p. 41–54, 1999.
- ARMOUR, J. A. Cardiac neuronal hierarchy in health and disease. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, [s. l.], v. 287, n. 2, p. R262-71, 2004.
- ARMOUR, J. A. Potential clinical relevance of the “little brain” on the mammalian heart. **Experimental Physiology**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 165–176, 2008.
- BACURAU, A. V. N. et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure : role of exercise training. [s. l.], p. 1631–1640, 2009.
- BANKS, A. Z. et al. Response to Exercise Training and Outcomes in Patients with Heart Failure and Diabetes Mellitus: Insights from HF-ACTION. **Journal of cardiac failure**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 485–491, 2016.
- BARAAS, F. et al. Effect of Short-Term Low-Intensity Exercise Training on Association of Oxygen Free Radicals and Nitric Oxide Production in Patients with Acute Myocardial Infarction. **J Angiol**, [s. l.], v. 22, p. 159–164, 2013.
- BATISTA, M. L. et al. Endurance training restores peritoneal macrophage function in post-MI congestive heart failure rats. **Journal of Applied Physiology**, [s. l.], v. 102, n. 5, p. 2033–2039, 2007.
- BÖHM, M. et al. Heart rate as a risk factor in chronic heart failure (SHIFT): the association between heart rate and outcomes in a randomised placebo-controlled trial. **The Lancet**, [s. l.], v. 376, n. 9744, p. 886–894, 2010.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, [s. l.], v. 52, p. 302–10, 1978.

CAMARGO-RAMOS, C. M.; CORREA-BAUTISTA, J. E.; RAM, R. Dietary Inflammatory Index and Cardiometabolic Risk Parameters in Overweight and Sedentary Subjects. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], 2017.

CASALI, A. G.; CASALI, K. R. **The SiSyPhus Project: BioMedical Data Analysis Package**, University of Milan, 2007.

CHABOT, A. et al. Role of aldosterone on lung structural remodelling and right ventricular function in congestive heart failure. **BMC Cardiovascular Disorders**, [s. l.], v. 11, p. 72, 2011.

CHEN, Y.-F. et al. Improvement of left ventricular remodeling after myocardial infarction with eight weeks L-thyroxine treatment in rats. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 40, 2013.

CHIU, Y.-T. et al. High-dose Norepinephrine Induces Disruption of Myocardial Extracellular Matrix and Left Ventricular Dilatation and Dysfunction in a Novel Feline Model. **Journal of the Chinese Medical Association**, [s. l.], v. 69, n. 8, p. 343–350, 2006.

CILOGLU, F. et al. Exercise intensity and its effects on thyroid hormones. **Neuroendocrinology letters**, [s. l.], v. 26, n. 6, p. 830–4, 2005.

COHEN, R. A.; TONG, X. Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease. **J Cardiovasc Pharmacol.**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 308–316, 2010.

COLANTUONI, A. et al. Effects of tetraiodothyronine and triiodothyronine on hamster cheek pouch microcirculation. **AJP: Heart and Circulatory Physiology**, [s. l.], v. 288, n. 4, p. H1931–H1936, 2004.

COLUCCI, W. S. et al. Adrenergic overload and apoptosis in heart failure: implications for therapy. **Journal of cardiac failure**, [s. l.], v. 6, n. 2 Suppl 1, p. 1–7, 2000.

CORSSAC, G. B. et al. Thyroid hormones effects on oxidative stress and cardiac remodeling in the right ventricle of infarcted rats. **Life Sciences**, [s. l.], v. 146, p. 109–116, 2016.

COX, A. G.; WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. **Biochem. J.**, [s. l.], v. 425, p. 313–325, 2010.

DANILOWICZ-SZYMANOWICZ, L. et al. Effect of various forms of physical training on the autonomic nervous system activity in patients with acute myocardial infarction. **Kardiologia Polska**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 558–565, 2013.

DATASUS. **TabNet Win32 3.0: Mortalidade - Brasil**. 2015. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>>. Acesso em: 31 out. 2017.

DE CASTRO, A. L. et al. Cardioprotective effects of thyroid hormones in a rat model of myocardial infarction are associated with oxidative stress reduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 391, n. 1–2, p. 22–29, 2014.

- DE CASTRO, A. L. et al. T3 and T4 decrease ROS levels and increase endothelial nitric oxide synthase expression in the myocardium of infarcted rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 408, n. 1–2, p. 235–243, 2015.
- DE CASTRO, A. L. et al. Thyroid hormones improve cardiac function and decrease expression of pro-apoptotic proteins in the heart of rats 14 days after infarction. **Apoptosis**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 184–194, 2016.
- DROBYSHEVA, A. et al. Cardiac sympathetic innervation and PGP9.5 expression by cardiomyocytes after myocardial infarction: effects of central MR blockade. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, [s. l.], v. 305, p. 1817–1829, 2013.
- ELLMAN, G. L. Tissue Sufhydryl Groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 82, p. 70–77, 1959.
- FEHR, H. G.; LÖTZERICH, H.; MICHNA, H. Human macrophage function and physical exercise: phagocytic and histochemical studies. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 613–7, 1989.
- FLACHSKAMPF, F. A. et al. Cardiac imaging after myocardial infarction. [s. l.], 2010.
- FLEG, J. L. et al. Exercise training as therapy for heart failure: current status and future directions. **Circulation: Heart Failure**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 209–220, 2015.
- FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, [s. l.], v. 105, p. 114–21, 1984.
- FRANGOIANNIS, N. G. Pathophysiology of myocardial infarction. **Comprehensive Physiology**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 1841–1875, 2015.
- FUKUDA, K. et al. Cardiac innervation and sudden cardiac death. **Circulation research**, [s. l.], v. 116, n. 12, p. 2005–19, 2015.
- GALLI, A.; LOMBARDI, F. Postinfarct Left Ventricular Remodelling: A Prevailing Cause of Heart Failure. **Hindawi Publishing Corporation**, [s. l.], v. 2016, p. 12, 2016.
- GARY, R. A. et al. A Combined Aerobic and Resistance Exercise Program Improves Physical Functional Performance in Patients With Heart Failure: A Pilot Study. **J Cardiovasc Nurs**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 418–430, 2012.
- GULATI, A. et al. Association of Fibrosis With Mortality and Sudden Cardiac Death in Patients With Nonischemic Dilated Cardiomyopathy. **JAMA**, [s. l.], v. 309, n. 9, p. 896, 2013.
- HACKNEY, A. C. et al. Testosterone responses to intensive interval versus steady-state endurance exercise. **Journal of Endocrinological Investigation**, [s. l.], v. 35, n. 11, p. 947–950, 2012. a.
- HACKNEY, A. C. et al. Thyroid hormonal responses to intensive interval versus steady-state endurance exercise sessions. **HORMONES**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 54–60, 2012. b.
- HAYKOWSKY, M. et al. A meta-analysis of the effects of exercise training on left ventricular remodeling following myocardial infarction: start early and go longer for

- greatest exercise benefits on remodeling. **Trials**, [s. l.], v. 12, p. 92, 2011.
- HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Right and left myocardial antioxidant responses during heart failure subsequent to myocardial infarction. **Circulation**, [s. l.], v. 96, n. 7, p. 2414–20, 1997.
- HORI, M.; NISHIDA, K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 81, p. 457–464, 2009.
- HU, L. W. et al. Thyroxine-induced cardiac hypertrophy: influence of adrenergic nervous system versus renin-angiotensin system on myocyte remodeling. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 285, n. 6, p. R1473–R1480, 2003.
- HU, M.-L. et al. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, [s. l.], v. 121, n. 2, p. 257–262, 1993.
- INDIK, J. H.; GOLDMAN, S.; GABALLA, M. A. Oxidative stress contributes to vascular endothelial dysfunction in heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, [s. l.], v. 281, p. H1767–H1770, 2001.
- JENEI, Z. M. et al. Elevated extracellular HSP70 (HSPA1A) level as an independent prognostic marker of mortality in patients with heart failure. **Cell stress & chaperones**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 809–13, 2013.
- JOHNS, T. N. P.; OLSON, B. J. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. **Annals of surgery**, [s. l.], v. 140, n. 5, p. 675–82, 1954.
- KARGARFARD, M.; ROUZBEHANI, R.; BASATI, F. Effects of exercise rehabilitation on blood pressure of patients after myocardial infarction. **International journal of preventive medicine**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 124–30, 2010.
- KLEIN, D.; KERN, R. M.; SOKOL, R. Z. A method for quantification and correction of proteins after transfer to immobilization membranes. **Biochemistry and molecular biology international**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 59–66, 1995.
- KOLETTIS, T. M. et al. Local conduction during acute myocardial infarction in rats: Interplay between central sympathetic activation and endothelin. **Journal of Arrhythmia**, [s. l.], v. 33, p. 144–146, 2017.
- KUMAR, V. et al. ROBBINS & COTRAN: Patologia - Bases Patológicas das Doenças. In: **ROBBINS & COTRAN: Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2009. p. 11–25.
- KVETNY, J.; MATZEN, L. E. Thyroid hormone induced oxygen consumption and glucose-uptake in human mononuclear cells. **Thyroidology**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 5–9, 1989.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970.
- LAFLAMME, M. A.; MURRY, C. E. Regenerating the heart. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 23, n. 7, p. 845–856, 2005.

- LANCASTER, L. D. et al. Changes in right ventricular relaxation during acute anterior myocardial infarction in pigs. **Cardiovascular research**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 46–52, 1989.
- LANG, C. C. et al. Effect of sympathoinhibition on exercise performance in patients with heart failure. **Circulation**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 238–45, 1997.
- LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical research in toxicology**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 227–31, 1992.
- LEE, C.-W. C.-W. et al. Supervised Phase II Cardiac Exercise Therapy Shortens the Recovery of Exercise Capacity in Patients with Acute Myocardial Infarction. **Journal of physical therapy science**, [s. l.], v. 26, n. 9, p. 1503–1508, 2014.
- LEE, T.-M.; CHANG, N.-C.; LIN, S.-Z. Inhibition of infarction-induced sympathetic innervation with endothelin receptor antagonism via a PI3K/GSK-3 β -dependent pathway. **Laboratory Investigation**, [s. l.], v. 97, n. 3, p. 243–255, 2017.
- LI, J. et al. Meta-Analysis Comparing Metoprolol and Carvedilol on Mortality Benefits in Patients With Acute Myocardial Infarction. **The American Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 120, n. 9, p. 1479–1486, 2017.
- LILLIE, R.; FULLMER, H. **Histologic Technic and Pratical Histochemistry**. 4. ed. New York: McGraw-Hill, 1976.
- LIM, Y. K. et al. Persistent smoking after a cardiovascular event: A nationwide retrospective study in Korea. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 10, p. e0186872, 2017.
- LINKE, A.; ERBS, S.; HAMBRECHT, R. Effects of exercise training upon endothelial function in patients with cardiovascular disease. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, [s. l.], v. 13, p. 424–32, 2008.
- LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 265–75, 1951.
- LUNA, L. Methods for reprocessing dried tissue specimens. **Histologic**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 1, 1978.
- MAKINO, A. et al. Thyroid hormone receptor- and vascular function. **AJP: Cell Physiology**, [s. l.], v. 302, n. 9, p. C1346–C1352, 2012.
- MALLIANI, A. et al. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 482–92, 1991.
- MARKLUND, S. L. Superoxide dismutase isoenzymes in tissues and plasma from New Zealand black mice, nude mice and normal BALB/c mice. **Mutation research**, [s. l.], v. 148, n. 1–2, p. 129–34, 1985.
- MASSON, P. Trichrome stainings and their preliminary techniques. **J Tech Met**, [s. l.], v. 12, p. 75, 1929.
- MATSUI, T. et al. Phenotypic Spectrum Caused by Transgenic Overexpression of Activated Akt in the Heart. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 277, n. 25, p. 22896–22901, 2002.
- MILLER, R. G. et al. ³¹P nuclear magnetic resonance studies of high energy

phosphates and pH in human muscle fatigue. Comparison of aerobic and anaerobic exercise. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], v. 81, n. 4, p. 1190–1196, 1988.

MOUROUZIS, I. et al. Thyroid hormone improves the mechanical performance of the post-infarcted diabetic myocardium: A response associated with up-regulation of Akt/mTOR and AMPK activation. **Metabolism**, [s. l.], v. 62, n. 10, p. 1387–1393, 2013.

MURPHY, E. A. et al. Role of lung macrophages on susceptibility to respiratory infection following short-term moderate exercise training. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], v. 287, n. 6, p. R1354–R1358, 2004.

NEGRÃO, C. E.; RONDON, M. U. P. B. Exercício físico, hipertensão e controle barorreflexo da pressão arterial. **Rev Bras Hipertens**, [s. l.], v. 8, p. 89–95, 2001.

NISHIUE, T.; TSUJI, H.; TARUMI, N. Heart Rate Variability and Left Ventricular Diastolic Function Early After Myocardial Infarction. [s. l.], v. 32, n. 3, 1999.

NOZAWA, E. et al. Performance of two-dimensional Doppler echocardiography for the assessment of infarct size and left ventricular function in rats. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 687–95, 2006.

ORTIZ, V. D. et al. Effects of thyroid hormones on aortic tissue after myocardial infarction in rats. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 791, p. 788–793, 2016.

OSIPOV, R. M. et al. Effect of hypercholesterolemia on myocardial necrosis and apoptosis in the setting of ischemia-reperfusion. **Circulation**, [s. l.], v. 120, n. SUPPL. 1, 2009.

PAGANI, M. et al. Spectral analysis of heart rate variability in the assessment of autonomic diabetic neuropathy. **Journal of the autonomic nervous system**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 143–53, 1988.

PAKARINEN, A.; HÄKKINEN, K.; ALLEN, M. Serum thyroid hormones, thyrotropin and thyroxine binding globulin in elite athletes during very intense strength training of one week. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 142–6, 1991.

PANTOS, C. et al. Thyroid hormone attenuates cardiac remodeling and improves hemodynamics early after acute myocardial infarction in rats. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 333–339, 2007.

PANTOS, C. et al. Long-term thyroid hormone administration reshapes left ventricular chamber and improves cardiac function after myocardial infarction in rats. **Basic Research in Cardiology**, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 308–318, 2008.

PANTOS, C. et al. Thyroid hormone at supra-physiological dose optimizes cardiac geometry and improves cardiac function in rats with old myocardial infarction. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 49–56, 2009.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and

hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. **Diabetes care**, [s. l.], v. 31 Suppl 2, 2008.

PEIXOTO, T. C. A. et al. Early Exercise-Based Rehabilitation Improves Health-Related Quality of Life and Functional Capacity After Acute Myocardial Infarction: A Randomized Controlled Trial. **Canadian Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 31, n. 3, p. 308–313, 2015.

PERON, A. P. O. N. et al. A função mecânica do miocárdio remanescente a um infarto do miocárdio é normal durante o período de cicatrização, embora exista insuficiência cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 105–112, 2006.

PERRELLI, M.-G.; PAGLIARO, P.; PENNA, C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. **world journal of cardiology**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 186–200, 2011.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of immunological methods**, [s. l.], v. 38, n. 1–2, p. 161–70, 1980.

POLYCHRONOPOULOS, E. et al. Dietary meat fats and burden of cardiovascular disease risk factors, in the elderly: a report from the MEDIS study. [s. l.], v. 9, n. 1, p. 30, 2010.

RAJAGOPALAN, V. et al. Safe Oral Triiodo-L-Thyronine Therapy Protects from Post-Infarct Cardiac Dysfunction and Arrhythmias without Cardiovascular Adverse Effects. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. e0151413, 2016.

RAJAGOPALAN, V. et al. Modified Low-Dose Triiodo-L-thyronine Therapy Safely Improves Function Following Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. **Frontiers in Physiology**, [s. l.], v. 8, p. 225, 2017.

RAJASINGH, J. et al. Improvement of Cardiac Function in Mouse Myocardial Infarction after Transplantation of Epigenetically- Modified Bone Marrow Progenitor Cells. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 6, n. 7, 2011.

RAJENDRAN, P. S. et al. Myocardial infarction induces structural and functional remodelling of the intrinsic cardiac nervous system. **J Physiol**, [s. l.], v. 5942, n. 5942, p. 321–341, 2016.

RODRIGUES, B. et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. **Cardiovascular diabetology**, [s. l.], v. 6, p. 38, 2007.

RUNDQVIST, B. et al. Increased cardiac adrenergic drive precedes generalized sympathetic activation in human heart failure. **Circulation**, [s. l.], v. 95, n. 1, p. 169–75, 1997.

SCHWENKE, D. O. et al. Early Ghrelin Treatment after Myocardial Infarction Prevents an Increase in Cardiac Sympathetic Tone and Reduces Mortality. **Endocrinology**, [s. l.], v. 149, n. 10, p. 5172–5176, 2008.

SHEEHAN, D. C.; HRAPCHAK, B. B. **Theory and practice of histotechnology**. Ohio: Battelle Press, 1980.

- SHEN, M. J.; ZIPES, D. P. Role of the autonomic nervous system in modulating cardiac arrhythmias. **Circulation Research**, [s. l.], v. 114, n. 6, p. 1004–1021, 2014.
- SHINDE, A. V.; FRANGOGIANNIS, N. G. Fibroblasts in myocardial infarction: A role in inflammation and repair. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [s. l.], v. 70, p. 74–82, 2014.
- STUART, S. D. F. et al. The crossroads of inflammation, fibrosis, and arrhythmia following myocardial infarction HHS Public Access. **J Mol Cell Cardiol**, [s. l.], v. 91, p. 114–122, 2016.
- SUN, Q. et al. Oxygen-coupled redox regulation of the skeletal muscle ryanodine receptor-Ca²⁺ release channel by NADPH oxidase 4. [s. l.], 2011.
- SUN, Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. **Cardiovascular Research**, [s. l.], 2009.
- TALMAN, V.; RUSKOAHO, H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction—from repair and remodeling to regeneration. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 365, p. 563–581, 2016.
- TAVARES, A. M. V. et al. Bone marrow derived cells decrease inflammation but not oxidative stress in an experimental model of acute myocardial infarction. **Life Sciences**, [s. l.], v. 87, n. 23–26, p. 699–706, 2010.
- TODA, N.; OKAMURA, T. Recent advances in research on nitrgic nerve-mediated vasodilatation. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, [s. l.], v. 467, n. 6, p. 1165–1178, 2015.
- TOLDO, S. et al. Right Ventricular Dysfunction following Acute Myocardial Infarction in the Absence of Pulmonary Hypertension in the Mouse. [s. l.], 2011.
- TRIMM, J. L.; SALAMAS, G.; ABRAMSONLL, J. J. Sulfhydryl Oxidation Induces Rapid Calcium Release from Sarcoplasmic Reticulum Vesicles *. [s. l.], n. 19, p. 16092–16098, 1986.
- ULU, N. et al. Effects of Ivabradine and Metoprolol on Cardiac Angiogenesis and Endothelial Dysfunction in Rats With Heart Failure. **J Cardiovasc Pharmacol**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 9–17, 2009.
- VAN DEN BORNE, S. W. M. et al. Myocardial remodeling after infarction: the role of myofibroblasts. **Nature Reviews Cardiology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 30–37, 2010.
- VAN HANDEL, E. Estimation of glycogen in small amounts of tissue. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 256–265, 1965.
- VASEGHI, M.; SHIVKUMAR, K. The Role of the Autonomic Nervous System in Sudden Cardiac Death Cardiac Autonomic Innervation: Neuroanatomy. **Prog Cardiovasc Dis**, [s. l.], v. 50, n. 6, p. 404–419, 2008.
- VENUGOPAL, J. R. et al. Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction. **J. R. Soc. Interface**, [s. l.], v. 9, p. 1–19, 2012.
- WAN, W. et al. Exercise training induced myosin heavy chain isoform alteration in the infarcted heart. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 226–232, 2014.

WANG, Y. et al. Exercise improves the dilatation function of mesenteric arteries in postmyocardial infarction rats via a PI3K/Akt/eNOS pathway-mediated mechanism. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, [s. l.], v. 299, n. 6, p. H2097-106, 2010.

WANG, Z.; NAKAYAMA, T. Inflammation, a link between obesity and cardiovascular disease. **Mediators of Inflammation**, [s. l.], v. 2010, p. 17, 2010.

WELSCH, M. A. et al. The association between flow-mediated dilation and physical function in older men. **Medicine and science in sports and exercise**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 1237–43, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015**. Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Top 10 causes of death**. 2016b. Disponível em: <http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/>.

XU, X. et al. Exercise training combined with angiotensin II receptor blockade limits post-infarct ventricular remodelling in rats. **Cardiovascular Research**, [s. l.], v. 78, n. 3, p. 523–532, 2008.


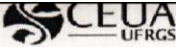
YAMASHITA, A. M. S. et al. Regulation of Cell Signaling Pathways Balance between S -nitrosylation and denitrosylation modulates myoblast proliferation independently of soluble guanylyl cyclase activation. [s. l.], n. 4, 2018.

YIN, F. C. et al. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **The American journal of physiology**, [s. l.], v. 243, n. 6, p. H941-7, 1982.

ZANELLA, A. M.; SOUZA, D. R. S.; GODOY, M. F. Influência do exercício físico no perfil lipídico e estresse oxidativo. **Arq Ciênc Saúde**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 107–12, 2007.

ZHANG, M. et al. Glycated proteins stimulate reactive oxygen species production in cardiac myocytes: Involvement of Nox2 (gp91phox)-containing NADPH oxidase. **Circulation**, [s. l.], v. 113, n. 9, p. 1235–1243, 2006.

ANEXO I – Comprovante de aprovação ética do estudo

	UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL	PRO-REITORIA DE PESQUISA Comissão De Ética No Uso De Animais	
---	--	--	---

CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 29521

Título: COMPARAÇÃO ENTRE O TRATAMENTO COM HORMÔNIOS T3 e T4, O TREINAMENTO FÍSICO OU A INTERAÇÃO DE AMBOS COMO TRATAMENTO ALTERNATIVO APÓS A OCORRÊNCIA DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO: EFEITOS SOBRE O EIXO RANK

Vigência: 01/07/2015 à 01/06/2019

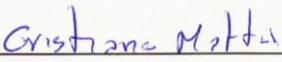
Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ALEX SANDER DA ROSA ARAUJO - coordenador desde 01/07/2015
Rayane Brinck Teixeira - Aluno de Doutorado desde 01/07/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 25/08/2015 - Sala Multiuso da Biblioteca Central - Andar Térreo do Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 174 animais, ratos machos Wistar, com peso médio de 200 ± 50 gramas, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 27 de Agosto de 2015



CRISTIANE MATTE
Coordenador da comissão de ética

1